



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA  
COGNITIVA E COMPORTAMENTO**

**ALANA NATALÍCIA VASCONCELOS DE ARAÚJO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO ORTO-  
EUGENOL EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO  
INDUZIDOS POR DEXAMETASONA**

**JOÃO PESSOA - PB**

**2018**

**ALANA NATALÍCIA VASCONCELOS DE ARAÚJO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO ORTO-  
EUGENOL EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO  
INDUZIDOS POR DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de MESTRE EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E COMPORTAMENTO – Área de concentração: Neurociência Cognitiva Pré-clínica e Clínica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori

**JOÃO PESSOA - PB**

**2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

A663i Araújo, Alana Natalícia Vasconcelos de.

Investigação da atividade antidepressiva do orto-eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona / Alana Natalícia Vasconcelos de Araújo. - João Pessoa, 2018.

84 f. : il.

Orientação: Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHLA.

1. Neurociência cognitiva. 2. Orto-eugenol - Atividade antidepressiva. 3. Tratamento farmacológico - Depressão. I. Salvadori, Mirian Graciela da Silva Stiebbe. II. Título.

UFPB/BC

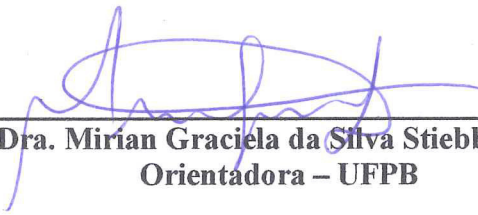
**ALANA NATALÍCIA VASCONCELOS DE ARAÚJO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO ORTO-  
EUGENOL EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE DEPRESSÃO  
INDUZIDOS POR DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento do Centro de Ciências Humanas, Letras e Artes da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de MESTRE EM NEUROCIÊNCIA COGNITIVA E COMPORTAMENTO – Área de concentração: Neurociência Cognitiva Pré-clínica e Clínica.

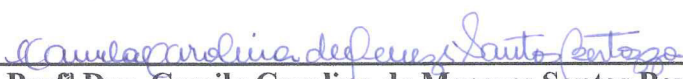
**Aprovado em 26/03/2018**

**BANCA EXAMINADORA**



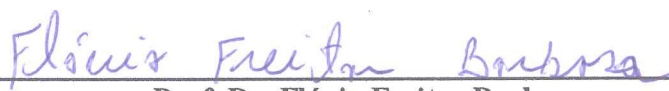
---

**Profª Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori**  
**Orientadora – UFPB**



---

**Profª Dra. Camila Carolina de Menezes Santos Bertozzo**  
**Examinadora Externa – UFCG**



---

**Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa**  
**Examinador Interno - UFPB**

*Aos meus pais, Maria e Iraildo, razão do meu ser.*

*A Elaine e Aline por todo amor e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por ter permitido a realização deste sonho e por ter me dado forças ao longo da caminhada. A ele, toda honra e toda glória.

Aos meus pais, que são as pessoas mais importantes da minha vida, por terem me ensinado a trilhar um caminho de integridade, e por me amarem incondicionalmente. Mainha, você é uma das razões de eu estar aqui no dia de hoje.

As minhas irmãs, Aline e Alaine, que são minhas companheiras desde sempre. Agradeço pelo apoio e amor que sempre me deram.

A Adaiano Farias, por estar comigo em todos os momentos importantes da minha vida, mesmo naqueles mais difíceis. Amo você!

A Ikla Cavalcante e Gabriela Coutinho, com certeza o maior presente que a UFPB me deu. Vocês foram os meus pilares, o meu apoio, a minha amizade sincera, o meu choro.

Agradeço a minha querida professora Mirian, por ter-me aceitado como aluna e ter me orientado sempre com muita paciência. Deus não poderia ter-me presenteado com uma orientadora melhor!

A Camila Carolina, pelo apoio para a concretização deste sonho, pelo exemplo de pesquisadora e ser humano.

A todos os funcionários do Biotério Prof. Dr. Thomas George, em especial a veterinária Roberta e Crispim.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento, pelos ensinamentos.

Aos meus queridos colegas de experimentos que não mediram esforços em colaborar, Ikla, Aline, Cesar, Erika, Tayla, Poliane, Gaby, Vinicius, Kaíque, Ynhan, Patrick e Douglas.

## RESUMO

ARAÚJO, A. N. V. **Investigação da atividade antidepressiva do orto-eugenol em modelos comportamentais de depressão induzidos por dexametasona**. 2018. 84p. Dissertação (Pós-graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento) – UFPB/CCHLA/ João Pessoa – PB.

A depressão é um transtorno do humor grave, recorrente e incapacitante. Acredita-se que sua etiologia seja resultado de várias anormalidades que interagem com fatores ambientais, sendo o estresse o principal fator ambiental com impacto para o surgimento da doença. Os óleos essenciais possuem uma variedade de compostos bioativos, como os fenilpropanoides. Estes possuem distintas atividades farmacológicas, como ansiolítica, anti-inflamatória, anticonvulsivante e antidepressiva, dentre outras. O orto-eugenol é um fenilpropanoide, análogo estrutural sintético do eugenol, o qual já apresentou diversas atividades farmacológicas, entre as quais a atividade antidepressiva. No entanto, a ausência de pesquisas sobre a possível atividade antidepressiva do orto-eugenol incentivou à realização deste trabalho. O presente estudo investigou a potencial atividade antidepressiva do orto-eugenol em camundongos fêmeas adultas submetidas ao modelo de estresse induzido pela dexametasona. Para investigar o perfil antidepressor do orto-eugenol, os animais foram pré-administrados com dexametasona (64µg/kg s.c.) 3h30min antes da realização dos testes comportamentais de suspensão da cauda, borrifagem de sacarose e campo aberto, sendo o orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg i.p) e a imipramina (10 mg/kg i.p.) administrados 30 minutos antes dos testes. No teste de suspensão da cauda, o grupo dexametasona aumentou o tempo de imobilidade dos animais, já o orto-eugenol na dose de 50 mg/kg diminuiu o tempo de imobilidade compatível com a droga padrão imipramina. O orto eugenol, na dose de 50 mg/kg, foi capaz de diminuir a latência para imobilidade em comparação com o grupo dexametasona. Em seguida, os animais foram avaliados no teste de borrifagem de sacarose, no qual o orto-eugenol (50 e 100 mg/kg) aumentou o tempo de *grooming* similarmente à imipramina. O grupo dexametasona aumentou a latência para o *grooming*, e as três doses do orto-eugenol e a imipramina diminuíram. Por último, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto para avaliar o número de cruzamentos, tempo no centro do campo, número de *rearing* e latência para o *rearing*. O orto-eugenol, a dexametasona e a imipramina não alteraram nenhum dos parâmetros do campo aberto. Na avaliação dos possíveis mecanismos de ação do orto-eugenol, foi escolhido o teste da suspensão na cauda e a dose de 50 mg/kg, que apresentou melhores efeitos nos testes descritos. A administração do antagonista SC23390, evidenciou a participação dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> na atividade antidepressiva do orto-eugenol, como também dos receptores α<sub>1</sub>-adrenérgicos com uso do antagonista prazosin, mas não dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/2C</sub> com o uso do antagonista ritanserina. Os achados demonstram que o protocolo da dexametasona foi capaz de induzir a depressão-símile, e que o orto-eugenol não interferiu na atividade locomotora dos animais e apresentou uma relevante atividade antidepressiva por meio dos receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e α<sub>1</sub>-adrenérgicos.

**Palavras-chaves:** Eugenol, Estresse, Fenilpropanoide, Mecanismo de ação.

## ABSTRACT

ARAÚJO, A. N. V. **Investigation of ortho-eugenol antidepressant activity in behavioral models of depression induced by dexamethasone.** 2018. 84p. Dissertation (Post-graduation in Cognitive Neuroscience and Behavior) – UFPB/CCHLA/ João Pessoa – PB.

Depression is a serious, recurring, and disabling mood disorder. It is believed that its etiology is the result of several abnormalities which interact with environmental factors, with stress being the main environment factor with impact on the emergency of the disease. Essential oils have a variety of bioactive compounds, such as phenylpropanoids. These have different pharmacological activities, such as anxiolytic, anti-inflammatory, anticonvulsant, and antidepressant, among others. Ortho-eugenol is a phenylpropanoid, a synthetic structural analogous to eugenol, which has already presented various pharmacological activities, including antidepressant activity. However, the lack of research on the possible antidepressant activities of ortho-eugenol encouraged the accomplishment of this work. This study examined the potential antidepressant activity of ortho-eugenol in adult female mice subjected to dexamethasone-induced stress model. To investigate ortho-eugenol antidepressant profile, the animals were pre-administered with dexamethasone (64µg/kg s.c.) 3h30 minutes before conducting behavioral tests such as tail suspension, sucrose spraying, and open field; being ortho-eugenol (50, 75 and 100 mg/kg i.p.) and imipramine (10 mg/kg i.p.) administered 30 minutes before testing. In the tail suspension test, dexamethasone group increased immobility time of the animals, while ortho-eugenol in doses of 50 mg/kg decreased immobility time compatible with the standard drug imipramine. Ortho-eugenol, in the dose of 50 mg/kg was able to decrease latency to immobility in comparison with dexamethasone group. Next, the animals were evaluated in the sucrose spraying test, in which ortho-eugenol (50 and 100 mg/kg) increased the *grooming* time similarly to imipramine. Dexamethasone group increased latency to *grooming*, and the three doses of ortho-eugenol and imipramine decreased. Finally, the animals were submitted to the open field test to evaluate crossing number, time in the center of the field, *rearing* number, and latency to *rearing*. Ortho-eugenol, dexamethasone, and imipramine did not alter any of the open field parameters. In evaluating possible action mechanisms ortho-eugenol, the tail suspension test in doses of 50 mg/kg was chosen, which presented the best effects in the described tests. The administration of the SC23390 antagonist emphasized D<sub>1</sub> dopaminergic receptors participation in ortho-eugenol antidepressant activity, as well as α<sub>1</sub> adrenergic receptor with the use of prazosin antagonist, and 5-HT<sub>2A/2C</sub> serotonergic receptors with the use of antagonist ritanserin. The findings demonstrated that dexamethasone protocol was able to induce depression-simile, and that ortho-eugenol did not interfere in locomotive activity of the animals and presented a relevant antidepressant activity through D<sub>1</sub> dopaminergic receptors and α<sub>1</sub> adrenergic.

**Keywords:** Eugenol, Stress, Phenylpropanoid, Action Mechanism.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo .....	18
<b>Figura 2</b> - Hipótese das monoaminas.....	19
<b>Figura 3</b> - Hipótese das neurotrofinas.....	20
<b>Figura 4</b> - Teoria do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal .....	23
<b>Figura 5</b> - Modificações estruturais, metabólicas e funcionais de pacientes com depressão.....	24
<b>Figura 6</b> - Estrutura química do eugenol.....	28
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do orto-eugenol.....	30
<b>Figura 8</b> - Camundongo Swiss.....	33
<b>Figura 9</b> - Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do orto eugenol .....	35
<b>Figura 10</b> - Representação dos comportamentos de imobilidade e mobilidade no TST.....	36
<b>Figura 11</b> - Teste de Borrifagem de Sacarose.....	37
<b>Figura 12</b> - Teste do campo aberto.....	38

## LISTA DE QUADROS

<b>Tabela 1</b> - Sintomas para diagnóstico de Depressão de acordo com o DSM-V .....	17
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.....	41
<b>Gráfico 2</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre a latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda.....	42
<b>Gráfico 3</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o tempo de <i>grooming</i> no teste de borrifagem de sacarose.....	43
<b>Gráfico 4</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre a latência para o <i>grooming</i> no teste de borrifagem de sacarose .....	44
<b>Gráfico 5</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto.....	45
<b>Gráfico 6</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina na sobre o tempo no centro no teste do campo aberto.....	46
<b>Gráfico 7</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina no número de <i>rearing</i> no teste do campo aberto.....	47
<b>Gráfico 8</b> - Efeito do orto-eugenol, salina, dexametasona e imipramina na latência para o <i>rearing</i> no teste do campo aberto.....	48
<b>Gráfico 9</b> - Efeito de antagonistas específicos na atividade antidepressiva do orto-eugenol no teste de suspensão da cauda.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Por cento
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>®</b>	Marca registrada
<b>° C</b>	Graus Celsius
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>ADTs</b>	Antidepressivos Tricíclicos
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AVP</b>	Vasopressina
<b>BNDF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CORT</b>	Corticosterona
<b>CRH</b>	Hormônio Liberador de Corticotrofina
<b>DEXA</b>	Dexametasona
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DSM-V</b>	Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5 <sup>a</sup>
<b>E.P.M.</b>	Erro padrão da média
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>HPA</b>	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
<b>IMAO</b>	Inibidores da Monoamina Oxidase
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>ISRSs</b>	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
<b>ISRSNs</b>	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina e da Noradrenalina
<b>mg/kg</b>	Miligrama por quilograma
<b>Min</b>	Minuto
<b>MAO</b>	Monoamina Oxidase
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NET</b>	Transportador de Noradrenalina
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OEs</b>	Óleos essenciais

<b>PET</b>	Tomografia por Emissão de Pósitrons
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>SERT</b>	Transportador de Serotonina
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>Tween 80</b>	Polioxetileno sorbitano monoleato 80
<b>TDM</b>	Transtorno Depressivo Maior
<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Fundamentação Teórica.....</b>	<b>16</b>
2.1. Aspectos Gerais da Depressão.....	16
2.1.1. Fisiopatologia da Depressão.....	17
2.1.1.1. Teoria do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal.....	21
2.2. Alterações Estruturais na Depressão.....	23
2.3. Tratamento Farmacológico da Depressão.....	25
2.4. Modelos Animais de Depressão.....	26
2.4.1. Modelo da Administração de Dexametasona.....	26
2.5. Óleos Essenciais.....	27
2.5.1. Eugenol e seus Análogos.....	28
2.5.2. Orto-eugenol.....	30
<b>3. Justificativa e Relevância.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
4.1. Geral .....	32
4.2. Específicos .....	32
<b>5. Material.....</b>	<b>33</b>
5.1. Animais.....	33
5.2. Condições experimentais.....	33
5.3. Substâncias utilizadas.....	34
5.4. Preparação do orto-eugenol e demais substâncias utilizadas.....	34
<b>6. Métodos.....</b>	<b>35</b>
6.1. Estudo da Atividade Antidepressiva.....	35

6.1.1. Teste de Suspensão da Cauda.....	36
6.1.2. Teste de Borrifagem de Sacarose.....	37
6.1.3. Teste do Campo Aberto.....	37
6.2. Investigação dos possíveis mecanismos de ação na atividade antidepressiva do orto-eugenol.....	38
6.2.1. Avaliação do Sistema Noradrenérgico.....	39
6.2.2. Avaliação do Sistema Serotoninérgico.....	39
6.2.3. Avaliação do Sistema Dopaminérgico.....	39
6.3. Análise e Gravação dos Vídeos.....	40
6.4. Análise Estatística.....	40
<b>7. Resultados.....</b>	<b>41</b>
7.1. Avaliação da atividade antidepressiva do orto-eugenol.....	41
7.1.1. Efeito do orto-eugenol no Teste de Suspensão da Cauda.....	41
7.1.2. Efeito do orto-eugenol no Teste de Borrifagem de Sacarose.....	43
7.1.3. Efeito do orto-eugenol no Teste do Campo Aberto.....	45
7.2. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na antidepressiva do orto-eugenol.....	49
<b>8. Discussão.....</b>	<b>50</b>
<b>9. Considerações Finais.....</b>	<b>56</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>57</b>
<b>11. Referências.....</b>	<b>58</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>71</b>
Certidão de Aprovação.....	72
Artigo em construção.....	73

## 1. Introdução

A depressão é um transtorno afetivo, caracterizado por alteração do humor. É a condição médica mais incapacitante, em termos de anos perdidos, tornando-se um problema de saúde pública devido a sua prevalência, sofrimento, morbidade e sobrecarga econômica (Shalan, Shantakumar & Laxmi, 2007; Grover, Dutt & Avasthi, 2010). O diagnóstico é baseado na manifestação clínica de um conjunto de sintomas, que são altamente variáveis e muitas vezes contrastantes.

Nos últimos 50 anos, uma diversidade de teorias tem sido propostas para desvendar a etiologia da depressão (Palazidou, 2012). A primeira delas foi a hipótese monoaminérgica, que ainda é uma das mais utilizadas para explicar a fisiopatologia da depressão, porém, apresenta algumas limitações, visto que a patogênese do transtorno vai muito além da disponibilidade de monoaminas (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013).

Diversas evidências sugerem que a exposição ao estresse pode ser um fator desencadeante para o desenvolvimento da depressão. Alguns estudos tem evidenciado que até 85% dos pacientes experienciam eventos estressantes antes do início dos sintomas depressivos (Parker, Schatzberg & Lyons, 2003). E a persistência ou a intensidade exagerada do estresse, podem tornar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) hiper-reativo, com prejuízos potenciais ao organismo (Krishnan & Nestler, 2008; Savitz & Drevetz, 2009).

Os medicamentos atualmente disponíveis no mercado têm um espectro de ação limitado e uma baixa tolerabilidade. Tendo em vista o fato de que as taxas de remissão com os tratamentos atuais estão limitados a cerca de 30%, há uma necessidade clara de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Kern, Sheldrick, Schmidt & Minkwitz, 2012).

Baseado nessas informações, os pesquisadores têm feito o uso de modelos animais como o teste de suspensão da cauda e o de borrifagem de sacarose, que submetem o animal a um evento altamente estressante e inescapável, na avaliação do desenvolvimento de alterações comportamentais, fisiológicas e neuroquímicas (Joca, Padovan & Guimarães, 2003)

Numerosas plantas medicinais apresentam relevantes atividades no SNC em condições crônicas tais como ansiedade, depressão, cefaleias e epilepsia, que não respondem bem aos tratamentos convencionais (Phillipson, 2001; Carlini, 2003; Blanco, Costa, Freire, Santos & Costa 2007). E delas são extraídos os óleos essenciais (OEs), que são misturas de compostos químicos voláteis e lipofílicos e/ou seus constituintes isolados, que já demonstraram possuir

uma ampla gama de propriedades biológicas, como ansiolítica (Liu *et al.*, 2012), anticonvulsivante (Wang, Levinson, Sun & Heinbockel, 2014) e antidepressiva (Iris *et al.*, 2004; Han, P., Han, T., Peng & Wang, 2013).

O orto-eugenol é um fenilpropanoide pouco estudado e já apresentou uma interessante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (Fonsêca *et al.*, 2016). Um vez que é análogo do eugenol, o qual já apresentou diversas atividades biológicas, inclusive antidepressiva, o presente trabalho objetiva contribuir para a pesquisa científica, no que se refere à investigação farmacológica em modelos animais de uma molécula promissora para a possível elaboração de um novo agente farmacológico com atividade antidepressiva.



## 2. Fundamentação Teórica

### 2.1. Aspectos Gerais da Depressão

A depressão é um distúrbio heterogêneo e multifatorial, que afeta negativamente os sentimentos, pensamentos e atitudes das pessoas, exibindo vários sintomas sendo os mais comuns a perda de interesse ou prazer nas atividades e profundo sentimento de tristeza. (American Psychiatric Association, 2017).

A doença não atinge apenas os próprios pacientes, mas traz impacto para suas famílias e altera o desempenho no trabalho, acarretando um elevado custo para a sociedade. Os transtornos de humor são um dos tipos mais frequentes de transtornos mentais, dos quais cerca de 75% são transtornos depressivos (Barbosa et al., 2017).

O distúrbio apresenta uma complexidade ainda maior quando ocorre em conjunto com outras afecções psiquiátricas como a ansiedade, causando um grande impacto na evolução da doença, resultando em sintomas e prejuízos funcionais mais graves, recuperação tardia, aumento de risco de recaídas, incapacidade e tentativas de suicídio (American Psychiatric Association, 2014).

Mundialmente, cerca de 322 milhões de pessoas sofrem de depressão, apresentando uma prevalência média de 4,4% na população geral. No Brasil, a OMS estima que 5,8% da população nacional é afetada pela depressão, estando na quinta posição no *ranking* mundial (World Health Organization, 2017).

A depressão é mais frequente em mulheres com idade entre 55 e 74 anos (World Health Organization, 2017). Do ponto de vista biológico essa maior prevalência no sexo feminino, pode estar associada a flutuações do hormônio estrogênio, sua retirada súbita ou seu déficit sustentado, que pode levar a uma expressiva alteração do humor, afetando os principais sistemas de neurotransmissores e, portanto, os níveis de noradrenalina, serotonina, dopamina e acetilcolina (Douma, Husband, O'donnell, Barwin & Woodend, 2005).

De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), a depressão apresenta várias classificações, sendo a mais prevalente e abordada em estudos o Transtorno Depressivo Maior (TDM). Para seu diagnóstico, segundo o DSM-V, um episódio depressivo maior é caracterizado pela comprovação de, no mínimo cinco, entre os nove sintomas citados na Tabela 1 e requer a presença de pelo menos um dos dois sintomas principais: humor deprimido ou perda de interesse, com duração mínima de duas semanas.

**Quadro 1 - Sintomas para diagnóstico de Depressão de acordo com o DSM-V**

---

Humor deprimido na maior parte do dia
Diminuição do interesse ou prazer
Perda ou ganho de peso (>5% de alteração em um mês)
Insônia ou hipersônia
Agitação ou retardo psicomotor
Fadiga ou perda de energia
Sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva
Capacidade diminuída para concentrar-se ou pensar
Pensamentos recorrentes de morte ou suicídio.

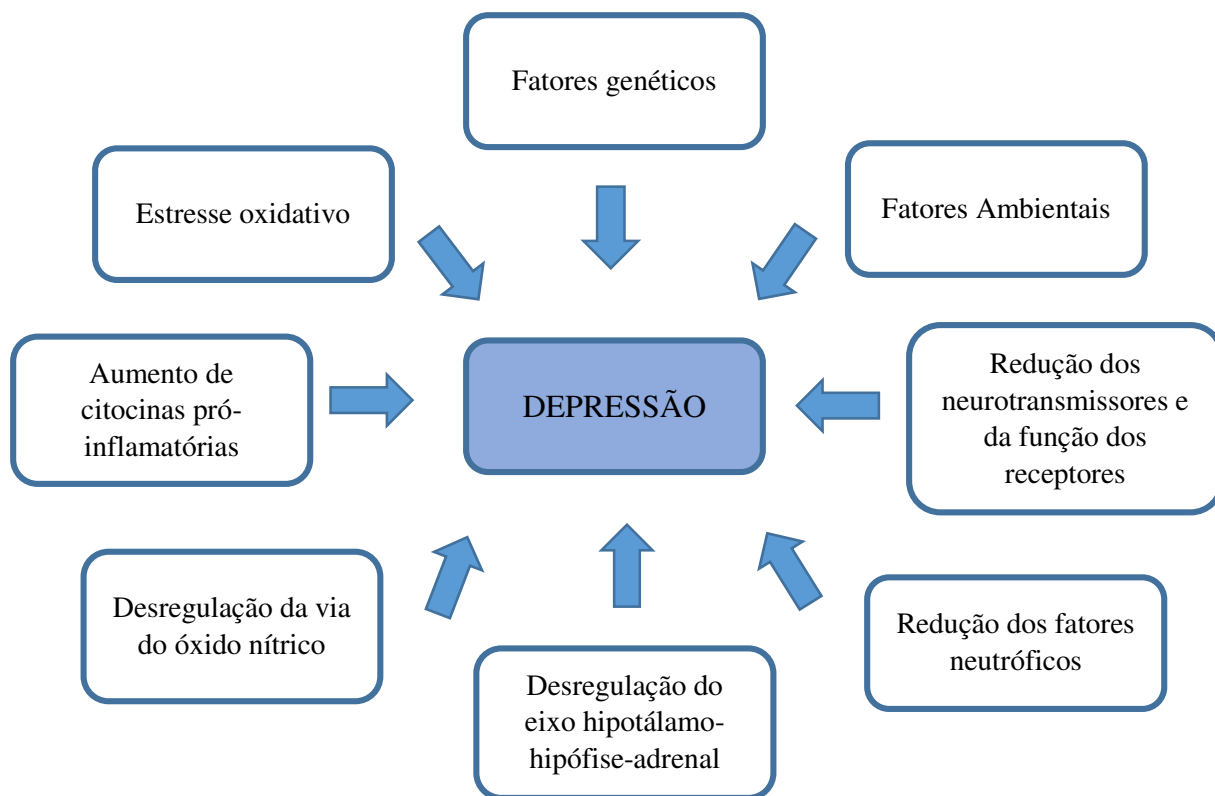
---

A compilação dos achados auxiliam para a evidenciar que a depressão é um transtorno de proeminente complexidade, sendo necessária a sua compreensão, diagnóstico e tratamento eficaz.

#### 2.1.1. Fisiopatologia da Depressão

A depressão por ser um transtorno multifatorial e de causas ainda desconhecidas é motivo de grande discussão em meio à sociedade científica, e muitas teorias tem sido sugeridas na tentativa de explicar a sua patogênese, incluindo a interação de vários fatores psicológicos, biológicos e sociais.

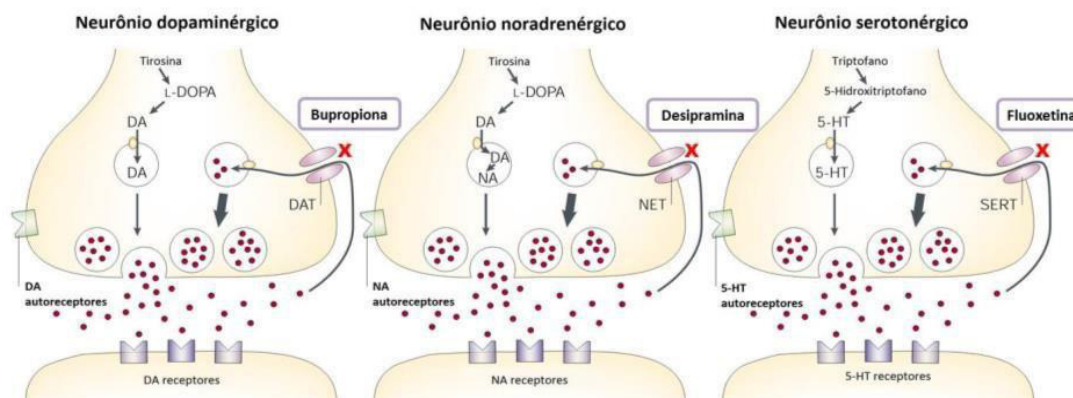
Diferentes hipóteses foram postuladas como mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo, sobressaindo a deficiência de monoaminas, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, a predisposição genética e influência de fatores ambientais, alterações na função do receptor e fator neurotrófico, desregulação da via do óxido nítrico, neuroinflamação e estresse oxidativo (Figura 1) (Chopra, Kumar & Kuhad, 2011; Kern, Sheldrick, Schmidt & Minkwitz, 2012).



**Figura 1** - Mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo. Fonte: Adaptado de Chopra, Kumar & Kuhad, 2011.

Por vários anos, a hipótese predominante sobre a fisiopatologia da depressão foi a deficiência das monoaminas serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA) na fenda sináptica (Schildkraut, 1965). A hipótese monoaminérgica é derivada do achado clínico de que a depleção das monoaminas pela droga anti-hipertensiva reserpina ocasionou depressão em pacientes que não sofriam da doença antes da terapia com a droga (Ferrari & Villa, 2017). Na mesma época, achados experimentais apontaram que a imipramina inibia a recaptação da noradrenalina no cérebro e era capaz de reverter os efeitos da reserpina em animais (Herting, Axelrod & Whitby 1961).

De acordo com esta hipótese e suas atualizações, a concentração das monoaminas pode ser modificada mediante uma perturbação na síntese, armazenamento ou liberação, ou esses podem permanecer inalterados, porém as funções dos receptores e/ou mensageiros intracelulares podem apresentar-se alteradas (Figura 2).



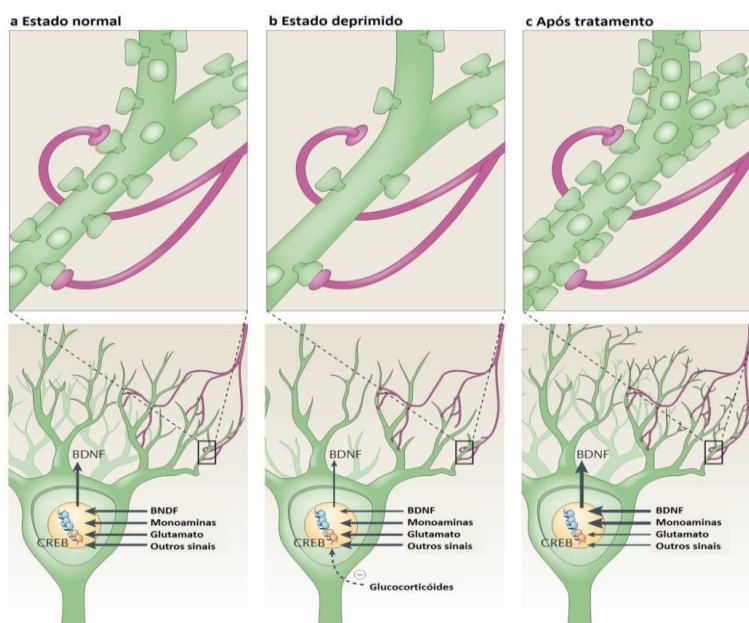
**Figura 2 - Hipótese das monoaminas.** A concentração das monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) na fenda sináptica está diminuída. O bloqueio dos sítios de recaptação (em vermelho) eleva a disponibilidade dos neurotransmissores monoaminérgicos, o que por conseguinte ativa seus receptores pós-sinápticos, revertendo o quadro depressivo. Fonte: Adaptado de Torres, Gainetdinov & Caron, 2003.

A epidemiologia genética tem reunido provas convincentes de que os transtornos do humor, incluindo a depressão, são substancialmente influenciados por fatores genéticos, e que estes são altamente complexos, com interações gene-gene e gene-ambiente (Lesch, 2004). Entre os muitos genes que foram identificados como conferindo vulnerabilidade ao transtorno, os estudos tem apoiado polimorfismos da região promotora do gene do transportador da serotonina (5HTTPR), de genes que regulam as funções do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, da catecol-O-metiltransferase (COMT), da enzima monoamina oxidase (MAO) e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Maletic & Raison, 2009).

Dentre as hipóteses propostas para explicar a patogênese da depressão, tem se sugerido que a diminuição dos fatores neurotróficos, que são proteínas reguladoras da neurogênese, crescimento e diferenciação neuronal, plasticidade, morte celular (Pallavi *et al.*, 2013), em áreas cerebrais podem ser um dos mecanismos fisiopatológicos do transtorno (Ye, Wang, G., Wang, H. & Wang, X., 2011; Yi *et al.*, 2014). Essa teoria advém de que o tratamento crônico com antidepressivos aumenta o nível de proliferação neuronal hipocampal em adultos (Sairanen *et al.*, 2005), promovendo o aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Russo-Neustadt & Chen, 2005).

A hipótese neurotrófica sugere que o estresse é uma das principais causas que levam à redução do BDNF, implicando numa atrofia das regiões límbicas do cérebro envolvidas no processamento de emoções e cognição, resultando em distúrbios do humor (Duman & Monteggia, 2006; Bus & Molendijk, 2016). Vale salientar que terapias que estimulam a elevação dos níveis de BDNF conseguem atingir a reversão dos sintomas depressivos em

pacientes com depressão resistentes a terapia, podendo ser utilizado como marcador de sucesso do tratamento (Hu *et al.*, 2010; Bumb *et al.*, 2014; Bilgen *et al.*, 2014).



**Figura 3 - Hipótese das neurotrofinas.** **a-** Neurônio piramidal hipocampal normal e sua inervação por neurônios glutamatérgicos, monoaminérgicos, outros tipos de neurônios e regulação por BDNF. **b.** O estresse grave causa alterações nestes neurônios, reduzindo sua arborização dendrítica e expressão de BDNF. A diminuição de BDNF é mediada em parte pelo excesso de glicocorticóides, que podem acarretar alterações nos mecanismos transcricionais normais (por exemplo, a ativação do regulador transcricional proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico (AMPc) (CREB)). **c.** Os antidepressivos aumentam a arborização dendrítica e expressão de BDNF. Fonte: Adaptado de Berton & Nestler, 2006.

Por sua vez, o óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira que possui uma capacidade de difusão livre através das membranas celulares, diferentemente dos outros neurotransmissores não é armazenado em vesículas sinápticas nem liberado por exocitose. Esse neurotransmissor possui múltiplos alvos e desempenha um papel em diversos processos fisiológicos do organismo, como na neurotransmissão, plasticidade sináptica, processos associados à aprendizagem, percepção da dor, agressividade e depressão (Esplugues, 2002; Dhir & Kulkarni, 2011).

O papel do NO na fisiopatologia da depressão veio à frente depois de se constatar que a paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS), é também um inibidor da enzima responsável pela síntese de NO a partir de L-arginina (Finkel *et al.*, 1996). A partir de então, um grande número de estudos demonstrou evidências para o envolvimento do NO na fisiopatologia da depressão.

Estudos tem referido a participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da depressão, sugerindo seu aumento e a diminuição das defesas antioxidantes (Palta, Samuel,

Miller & Szanton, 2014; Chopra, Kumar & Kuhada, 2011). O estresse oxidativo refere-se aos efeitos biologicamente prejudiciais dos radicais livres. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), é um processo normal no metabolismo aeróbio, e as EROs exercem várias funções fisiológicas na sinalização celular e na defesa contra agentes patogênicos. Contudo, quando presentes em excesso causam danos aos lipídios, proteínas e DNA, podendo resultar em morte celular (Black, Bot, Scheffer, Cuijpers & Penninx, 2015).

Os mecanismos imunológicos também foram implicados na fisiopatologia da depressão. As citocinas são proteínas e glicoproteínas que atuam como mensageiros químicos responsáveis pela homeostasia das células imunes e pela regulação da resposta inflamatória (Chopra, Kumar & Kuhada, 2011). A hipótese inflamatória da depressão deriva de observações clínicas de pacientes com depressão, os quais apresentaram elevação dos biomarcadores inflamatórios no sangue, incluindo citocinas inflamatórias, que demonstraram ter acesso ao cérebro e interagir com quase todos os mecanismos fisiopatológicos conhecidos como envolvidos na depressão, incluindo o metabolismo dos neurotransmissores, a função do eixo HPA e plasticidade neural (Miller, Maletic & Raison, 2009).

#### 2.1.1.1. Teoria do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

O termo estresse pode ser definido como uma percepção cognitiva de estímulo incontrollável e/ou de imprevisibilidade, culminando em uma resposta comportamental e fisiológica que altera a homeostase. O organismo, em situações de exposição crônica a estressores, pode produzir uma resposta mal adaptativa, gerando consequências prejudiciais para o indivíduo (Koolhaas *et al.*, 2011).

Alguns estressores da vida diária como trânsito, dificuldade financeira e problemas conjugais, apresentam um impacto importante na patogênese dos transtornos de humor, principalmente no desencadeamento de quadros depressivos, já estando bem estabelecidos como precipitantes agudos de doenças psiquiátricas (Kendler, Sheth, Gardner & Prescott, 2002; Timmermans, Xiong, Hoogenraad & Krugers, 2013).

Na infância e adolescência, a ocorrência de eventos estressantes e traumáticos, podem ser notados como perturbadores do desenvolvimento neurológico, pois importantes estruturas cerebrais estão sendo formadas e o incidente de eventos perturbadores poderiam tornar alguns indivíduos mais vulneráveis a certos tipos de transtornos psicopatológicos, incluindo

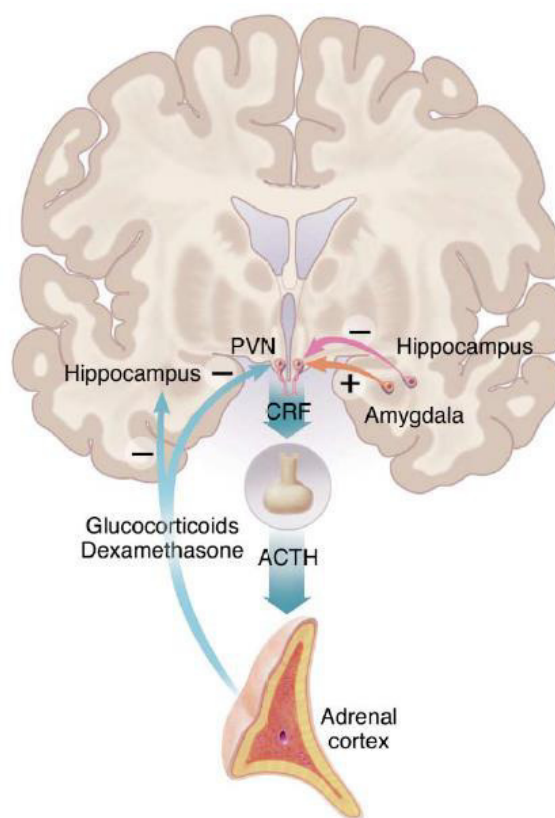
depressão, transtorno bipolar e ansiedade (Tofoli, Baes, Martins & Juruena, 2011; Pechtel & Pizzagalli, 2011).

A maior resposta fisiológica ao estresse é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013). Este incorpora as funções neurológicas e estímulos sensoriais à função endócrina, sendo o principal sistema que ajuda o indivíduo a lidar com eventos estressantes (Berton & Nestler, 2006). Diversos estudos apontam que a desregulação no funcionamento do eixo HPA juntamente com a elevação dos níveis de glicocorticoides, desempenham um papel central na patogênese da depressão. O glicocorticoide, chamado de cortisol em humanos e corticosterona em roedores, controla as funções periféricas do corpo como o metabolismo e a imunidade, e também executa um importante papel sobre o encéfalo (Herbert et al., 2006; Pariante & Lightman, 2008).

Diante de um estímulo estressor ocorre, inicialmente a secreção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e vasopressina pelas células paraventriculares hipotalâmicas (PVN), que atuam na ativação do eixo HPA. Na hipófise anterior, o CRH e PVN estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e este será liberado na corrente sanguínea. Nas glândulas adrenais, existem receptores para o ACTH, que promovem a síntese e liberação dos glicocorticoides, principalmente, o cortisol em humanos (Figura 4) (Nemeroff, 1996; Cunha, Brambilla & Thomas 2010; Goncharova, 2013; Kyrou & Tsigos, 2009). Os glicocorticoides quando ligados a receptores hipocampais, realizam o *feedback* negativo, reduzindo a estimulação do eixo HPA (Carrasco & Van de Kar, 2003). Este controle inibitório ajuda na regulação da resposta ao estresse e auxilia na supressão dessa resposta quando o estímulo estressor cessa (Swaab, Bao & Lucassen, 2005; Aguilera, Kiss, Liu & Kamitakahara, 2007). Porém, quando níveis elevados de cortisol são mantidos, esses mecanismos de controle inibitório são interrompidos. O aumento excessivo do cortisol pode causar atrofia hipocampal, devido a ser tóxico para as células do hipocampo (Malykhin & Coupland, 2015), também é capaz de estimular inflamação periférica, liberando mediadores inflamatórios que atingem o SNC, diminuição de fatores tróficos e produção de monoaminas. Estes são alguns dos fatores associados ao desenvolvimento da depressão (Miller, Maletic & Raison, 2009).

Diversas evidências clínicas comprovam a relação do eixo HPA com a depressão. A hipercortisolemia é encontrada em mais de 50% dos pacientes com transtorno depressivo, e evidenciam a falta da liberação pulsátil do cortisol que podem ser revertidos por tratamento com antidepressivos (Sternier & Kalynchuk, 2010). Em outro estudo foi encontrado um aumento do cortisol livre urinário, elevação dos níveis de CRH em líquido cefalorraquidiano e

uma diminuição da supressão do cortisol por dexametasona em portadores do transtorno (Nestler *et al.*, 2002; Southwick, Vythilingam & Charney, 2005). Dessa forma, fica evidente a importância do eixo HPA na fisiopatologia da doença.



**Figura 4** - Teoria do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Fonte: Adaptado de Nestler *et al.*, 2002.

## 2.2. Alterações Estruturais na Depressão

Devido ao aperfeiçoamento dos métodos de neuroimagem, vários estudos demonstraram alterações em áreas neuroanatômicas de pacientes com distúrbios depressivos. Encontraram-se alterações em regiões do sistema límbico, como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal (Figura 5) (Drevets, 2010; Geuze, Vermetten & Bremner, 2005).

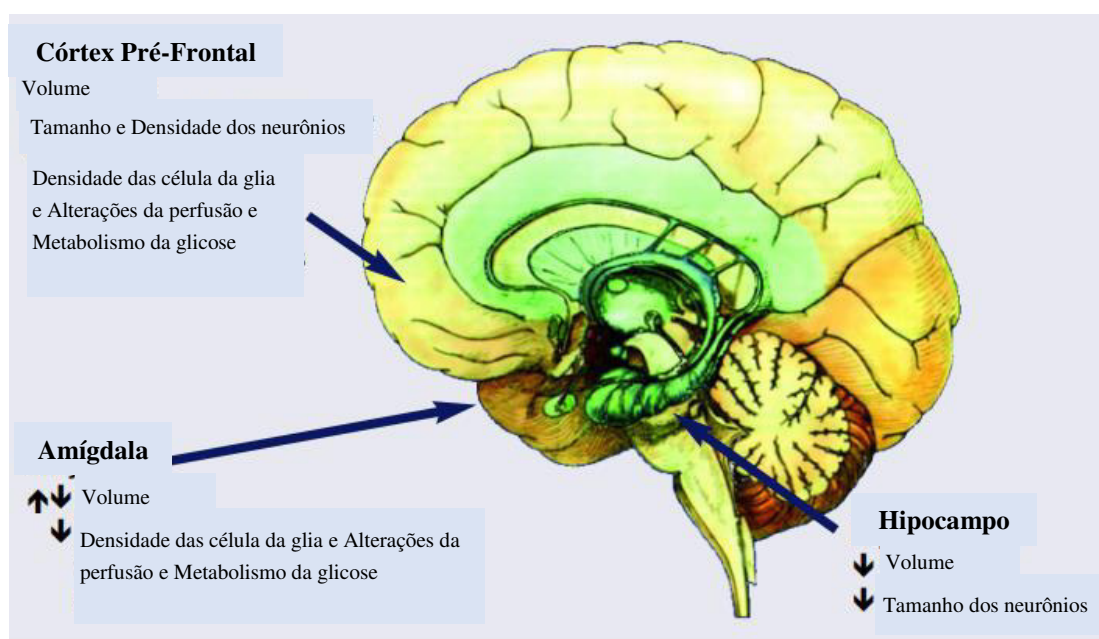
Estudos com Ressonância Magnética de pacientes depressivos quando comparados com os saudáveis, exibiram grandes reduções de volume nas regiões frontais, especialmente, no córtex anterior e no córtex orbitofrontal, e moderada redução no hipocampo, núcleo caudado e putamen (Koolschijn *et al.*, 2009). Além disso, observou-se que as terapias medicamentosas bem sucedidas levam à normalização do volume do hipocampo (Sheline,



Gado & Kraemer, 2003). Pressupõem-se, portanto, que os glicocorticoides exercem um relevante papel neste evento da neuroplasticidade.

McEwen (1999), por meio da análise histológica encontrou uma redução significativa dos dendritos apicais de neurônios piramidais do hipocampo de ratos, após o tratamento com corticosterona por várias semanas. Assim, o hipocampo tem exibido a maior concentração de receptores glicocorticoides de todas as regiões do cérebro, e está ligado anatômica e fisiologicamente ao hipotálamo através de um feixe de axônios, o fórnix, sendo um regulador do feedback do eixo HPA (Kloet, Vreugdenhil, Oitzl & Joëls, 1998; Palazidou, 2012). Deste modo, pacientes com distúrbio depressivo exibem aumento nas concentrações plasmáticas de cortisol e modificações na sensibilidade do receptor, tais alterações estão vinculadas a regulação cerebral em situações de estresse.

Registros de Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) e Ressonância Magnética em pacientes com depressão encontraram uma hiperatividade da amígdala. Então, foi postulado a hipótese de que essa hiperatividade aciona de maneira mais intensa estímulos negativos nos pacientes. A hiperativação pode ser consequência de um insuficiente controle da amígdala pelo córtex pré-frontal ventromedial e orbital. Também foi encontrado que pacientes que não recebem tratamento apresentam um volume da amígdala reduzido em relação aos que estavam sendo medicado (Savitz & Drevetz, 2009; Hamilton, Siemer & Gotlib, 2000).



**Figura 5** – Modificações estruturais, metabólicas e funcionais de pacientes com depressão. Fonte: Adaptado de Fuchs & Flügge, 2005.

### 2.3. Tratamento Farmacológico da Depressão

A descoberta dos antidepressivos possibilitou um grande progresso no tratamento da depressão, sobressaindo-se como recurso terapêutico mais utilizado para o tratamento deste transtorno (Drapier *et al.*, 2007). Os fármacos antidepressivos melhoram o humor por vários mecanismos, que são baseados no aumento da disponibilidade de neurotransmissores, através do bloqueio da recaptura ou degradação neuronal de neurotransmissores ou atuação em receptores pré ou pós-sinápticos (Nemeroff & Owens, 2002). Várias classes de antidepressivos estão disponíveis no mercado, e são classificados de acordo com sua estrutura química (Ebmeier, Donaghey & Steele, 2006).

Os inibidores da monoaminoxidase (IMAO) foram um dos primeiros antidepressivos descobertos. Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio da enzima monoamina oxidase, que possui duas isoformas: MAO-A, que está relacionada com degradação de serotonina e noradrenalina e adrenalina, e MAO-B que degrada a feniletilamina e benzilamina. Ambas as isoformas desaminam a dopamina, a tiramina e triptamina. Os IMAOs apresentam vários efeitos colaterais, e o principal é a crise hipertensiva provocada pela sua ingestão combinada com alimentos contendo tiramina, que é uma amina encontrada em quantidade elevada em alguns alimentos, sendo metabolizada pela MAO (Hillhouse & Porter, 2015; Shulman & Herrmann, 2013).

Os antidepressivos tricíclicos (ADTs) possuem essa nomenclatura por possuírem na sua estrutura química três anéis benzênicos. A imipramina foi o primeiro medicamento descoberto dessa classe. O mecanismo de ação dos ADTs ocorre em nível pré-sináptico pelo bloqueio dos transportadores de serotonina e noradrenalina, elevando o nível destas na fenda sináptica; contudo, bloqueiam também receptores pós-sinápticos muscarínicos, histamínicos e adrenérgicos (Hillhouse & Porter, 2015; Stahl, 2014).

Devido à baixa seletividade dos fármacos antidepressivos de primeira geração, novos antidepressivos foram criados. Dentre esses, estão os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs), sendo os mais utilizados para o tratamento da depressão. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a recaptção de serotonina na fenda sináptica, aumentando sua concentração. Possuem menor incidência de efeitos colaterais, porém podem provocar disfunção sexual, distúrbios gastrintestinais, sonolência e ganho de peso (Cipriani *et al.*, 2009; Hillhouse & Porter, 2015).

Os inibidores seletivos de recaptação de serotonina e noradrenalina (ISRSNs), atuam inibindo tanto o transportador de serotonina (SERT) quanto o de noradrenalina (NET). Apresentam efeitos colaterais semelhantes aos dos ISRS, a exemplo da disfunção sexual. Algumas evidências sugerem que os ISRSNs podem ser mais efetivo para o tratamento da depressão em comparação com ISRSs (Papakostas, Thase, Fava, Nelson, & Shelton, 2007; Clayton et al., 2002; Stahl, Grady, Moret, & Briley, 2005).

Novos alvos farmacológicos para o tratamento da depressão vem sendo estudados, como o antagonismo dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) pela cetamina, que tem exercido um efeito antidepressivo de forma rápida em pacientes com resistência aos medicamentos atualmente disponíveis. O antagonismo dos receptores muscarínicos de acetilcolina pela escopolamina tem fornecido novas idéias terapêuticas. Como também, a modulação da sinalização de melatonina tem sido explorada como uma potencial estratégia terapêutica no tratamento da depressão (O'Leary, Dinan & Cryan, 2014)

## 2.4. Modelos Animais de Depressão

Os modelos animais são importantes ferramentas para o estudo da fisiopatologia da depressão, bem como para o desenvolvimento e triagem de novas drogas terapêuticas (Duman, 2010; Overstreet, 2012). Reproduzir os sintomas da depressão em humanos em animais de laboratório, e considerar que um animal está deprimido não é algo fácil. Entretanto, existem diversos modelos experimentais validados para o estudo do comportamento depressivo, principalmente em roedores (Duman, 2010; Willner & Mitchell, 2002).

Tem-se desenvolvido modelos animais com o objetivo estabelecer o efeito do estresse no desenvolvimento da depressão, tais como: modelos do estresse crônico moderado, modelo da administração de corticosterona e dexametasona (Kim & Han, 2006; Zhao *et al.*, 2008; Shyti *et al.*, 2015, Wróbel, Serefko, Wlaż & Poleszak, 2014).

### 2.4.1. Modelo da Administração de Dexametasona

Em roedores, achados indicaram que a administração única ou repetida de dexametasona (DEXA) ativaram genes relacionados ao estresse, e induziram o comportamento depressivo avaliado pelos testes comportamentais do nado forçado, transição

claro-escuro e preferência por sacarose e, modificou a atividade de fármacos antidepressivos de várias classes (Skupio *et al.*, 2014; Wróbel, Serefko, Wlaź & Poleszak, 2014). O estudo de Patel e Udayabanu (2014), evidenciou que injeções de dexametasona durante 12 semanas em camundongos resultaram no desenvolvimento de um estado diabético, hipercortisolemia, estresse oxidativo, déficits cognitivos e um comportamento semelhante à depressão, que foram revertidos pela administração do extrato de *Urtica dioica*.

Foi demonstrado que repetidas injeções de corticosterona (CORT) provocaram alterações comportamentais e neuroquímicas similares à depressão (Zhao *et al.*, 2008; Pitta *et al.*, 2013; Mao, Huang, Ip, Xian & Che, 2012; Shity *et al.*, 2015).

Baseado nestes resultados, foi possível concluir que esse modelo da administração de dexametasona é válido para o estudo da fisiopatologia da depressão e para avaliar a eficácia de novas drogas antidepressivas (Sternier & Kalynchuk, 2010).

## 2.5. Óleos Essenciais

Os óleos essenciais (OEs) constituem os elementos voláteis das plantas aromáticas encontradas principalmente em países de clima temperado e tropical (Bakkali, Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, 2008). São produzidos por estruturas secretoras presentes em várias partes de plantas, como folhas, cascas e sementes (Burt, 2004; Mayaud *et al.*, 2008).

Geralmente, os OEs têm sabor ácido e picante, quando extraídos são incolores ou ligeiramente amarelados. Possuem instabilidade na presença de luz, calor, ar, umidade e metais. Em temperatura ambiente, são líquidos de aparência oleosa, apresentam alta volatilidade e, recebem o nome de essenciais devido ao aroma agradável e intenso da maioria da classe (Simões & Spitzer, 2004).

Na natureza, os OEs apresentam relevantes funções nas plantas, já que são formados de elementos que atuam na preservação da integridade das mesmas funcionando como sinais de comunicação química, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura (Makkar *et al.*, 2007).

Os OEs demonstram possuir uma série de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana (Pragadheesh, 2013), antioxidante (Sanchez- Vioque *et al.*, 2013), antidiabética (Misra & Dey, 2013) anti-inflamatória (Barbieri Xavier *et al.*, 2013) e antidepressiva (Victory, Brahm & Savegnago, 2013).

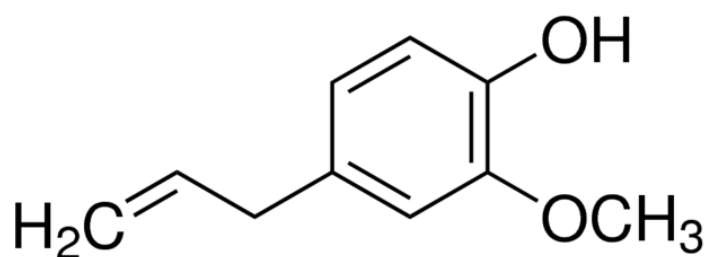
A composição química dos OEs é composta por elementos básicos como carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo formados por uma mistura de várias moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outras. A grande maioria, no entanto, é constituída de terpenos em maior quantidade, seguido dos fenilpropanoides (Bakkali, Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, 2008).

Os fenilpropanoides são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina, que é convertido em ácido cinâmico, por sua vez, o grupo ácido carboxílico deste é reduzido produzindo os fenilpropanoides. Esse composto orgânico é gerado por plantas para protegê-las de infecções, radiações ultravioletas e herbívoros (Sá *et al.*, 2014; Fonsêca, 2016).

De acordo com a literatura, as famílias de plantas que possuem os compostos fenilpropanoides biologicamente ativos são: Asteraceae, Crassulaceae, Araliaceae, Scrophulariaceae, Salicaceae, Plantaginaceae, Thymelaeaceae, Lamiaceae, Oleaceae (Kurkin, 2003).

#### 2.5.1. Eugenol e seus Análogos

O eugenol é um derivado fenilpropanoide farmacologicamente ativo (Figura 6), conhecido popularmente como essência de cravo, pois está presente em grande quantidade no óleo de cravo da Índia (*Eugenia aromatica*) (Escobar, 2002). Também é encontrado em óleos essenciais de plantas como *Eugenia caryophyllus*, *Dicypelium cariophyllatum*, *Ocimum gratissimum* e o *Croton zenhtneri* (Wu, Hwang, Liao & Chen, 1994). O eugenol é sintetizado biologicamente, a partir do aminoácido fenilalanina, através da rota metabólica do ácido chiquímico (Senanayake, Wills & Lee, 1977). Na odontologia, tem sido extensamente utilizado há décadas por seu efeito analgésico (Frisch & Bhaskar, 1968; Kozam, 1977; Ohkubo & Shibata, 1997; Ehrmann, Messer & Adams, 2003).



**Figura 6** – Estrutura química do eugenol. Fonte: Sigma-Aldrich.

Diversos estudos tem relatado as várias propriedades biológicas do eugenol, destacando-se a atividade antibacteriana, anticonvulsivante, antiespasmódica e antinociceptiva (Sayyah, Valizadeh & Kamalinejad, 2002; Dal Bó, Luiz, Martins, Mazzardo-Martins & Santos, 2012). De acordo com o estudo realizado por Iris e colaboradores (2004), o tratamento com eugenol durante 14 dias promoveu uma atividade antidepressiva semelhante à da imipramina nos testes do nado forçado e suspensão da cauda em camundongos, além disso evidenciou que o eugenol induziu o aumento do BDNF no hipocampo.

O dehydrodieugenol (DHDE) também conhecido como bis-eugenol, é um análogo estrutural do eugenol, encontrado na espécie *Syzygium aromaticum* e em alguns produtos naturais, como geraniol comercial (Jones & Haller, 1949; Miyazawa & Hisama, 2003). Amaral e colaboradores (2012), identificaram que a substância possui atividade antidepressiva nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, por alteração dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenergico.

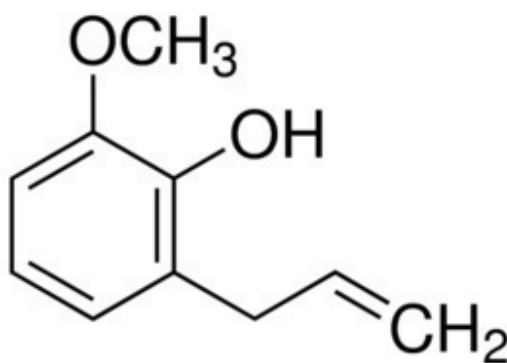
O estragol é um fenilpropanoide, análogo químico do eugenol, sendo o principal constituinte da *Croton zehntneri*, conhecida no nordeste brasileiro por canela de cunhã, canelinha ou canela-brava (Coelho-de-Souza, 2013). Também presente no óleo essencial da planta *Ravensara anisata*, *Ocimum basilicum* e *Artemisia dracuncululus* (Craveiro *et al.*, 1981; Franchome & Penoel, 1995). A literatura evidencia que o estragol apresenta atividades biológicas como anestésica, anti-inflamatória e anti-edematogênica (Leal-Cardoso *et al.*, 2004; Ponte *et al.*, 2012; Silva-Comar *et al.*, 2014).

O  $\alpha$ -asarone é um análogo estrutural do eugenol, sendo um componente majoritário do óleo essencial de rizomas das plantas *Acorus calamus* Linn, *Acorus tatarinowii* Schott e *Acorus gramineus* Solander, utilizadas na China para o tratamento de doenças respiratórias (Huang *et al.*, 2013; Wang, Levinson, Sun & Heinbockel, 2014). O  $\alpha$ -asarone demonstrou um efeito ansiolítico nos testes do labirinto em cruz elevado, transição claro-escuro e consumo de alimentos (Liu *et al.*, 2012). O tratamento agudo com  $\alpha$ -asarone revelou uma atividade antidepressiva no teste de suspensão da cauda (TST) e nado forçado (Han, P., Han, T., Peng & Wang, 2013). Além disso, exibiu um efeito bifásico no TST, no qual o efeito antidepressivo foi observado em doses mais baixas e o efeito depressivo em doses mais altas (Chellian, Pandey & Mohamed, 2016).

### 2.5.2. Orto-eugenol

O orto-eugenol é um isômero sintético do eugenol, que contém um anel benzênico. Este apresentou um efeito antinociceptivo mediado pelo sistema adrenérgico, e anti-inflamatório através da regulação de citocinas pró-inflamatórias e fosforilação de NF-kB e p38 em camundongos (Fonsêca *et al.*, 2016).

O eugenol e seu análogos são apontados como promissores alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças que atingem o SNC, principalmente a depressão. A partir disso, surgiu o interesse em pesquisar se o orto-eugenol também apresenta atividade antidepressiva.



**Figura 7** – Estrutura química do orto-eugenol. Fonte: Sigma-Aldrich.

### 3. Justificativa e Relevância

A depressão é um transtorno crônico e recorrente, que afeta a vida dos indivíduos, sendo mais prevalente em mulheres. A sua fisiopatologia não está totalmente esclarecida, o que reflete diretamente na falta de medicamentos ideais para o seu tratamento, uma vez que, os fármacos utilizados na atualidade apresentam um início de ação lento e muitos eventos adversos, somado ao problema de que uma grande parcela dos pacientes não responde bem à terapia com antidepressivos (Nestler et al., 2002; Berlim & Turecki, 2007).

O desenvolvimento de novos agentes antidepressivos com início de ação mais rápido e menos efeitos adversos teria um impacto substancial tanto para o paciente quanto para a saúde pública em geral.

Grande parte da população faz o uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica. E o uso destas como matérias-primas para a síntese de substância bioativas, tem sido amplamente realizada ao longo do tempo. O eugenol é uma substância extraída de plantas, que já apresentou diversas atividades biológicas, destacando-se a antidepressiva em camundongos machos. Diante disto, o orto-eugenol por ser uma um isômero sintético do eugenol e ainda pouco estudado, pode ser uma droga em potencial para o tratamento da depressão.

O presente estudo avança na investigação dos efeitos do orto-eugenol na depressão, através de um modelo pré-clínico de depressão-símile baseado na administração aguda de dexametasona em camundongos fêmeas.



## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo Geral

Investigar o efeito do tratamento agudo do orto-eugenol em modelos animais comportamentais de depressão-símile induzidos por dexametasona e os possíveis mecanismos de ação.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Induzir o comportamento depressivo-símile por meio da administração de dexametasona em camundongas fêmeas;
- Verificar se o orto-eugenol apresenta atividade antidepressiva, utilizando os testes de suspensão da cauda e borrifagem de sacarose;
- Analisar se o orto-eugenol altera a atividade locomotora no teste do campo aberto;
- Caracterizar o mecanismo de ação antidepressivo do orto-eugenol, por meio da investigação das vias serotoninérgicas, adrenérgicas e dopaminérgicas.

## 5. Material

### 5.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, albinas Swiss, pesando entre 25-35g com, aproximadamente, 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba.

Os animais foram alocados em gaiolas de polietileno, com um máximo de 20 camundongos por caixa. Estes permaneceram sob temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ), com livre acesso a ração tipo *pellets* (Purina®) e água disponível em garrafas de polietileno, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 as 18h00.



**Figura 8** – Camundongo (*Mus musculos*) Swiss. Fonte: Google Imagens.

### 5.2. Condições Experimentais

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Psicofarmacologia, no qual os animais foram previamente pesados e alojados em gaiolas de polietileno, contendo 4 animais cada, com pelo menos 12 horas de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação. Os camundongos foram mantidos a temperatura  $21 \pm 1^\circ$ , privados de água e ração 60 minutos antes dos testes.

Antes de cada procedimento experimental, a bancada foi limpa com etanol 70%, e para que não ocorresse influência durante os testes, foi utilizado etanol de baixa graduação

(10%). Todos os experimentos foram executados no período das 6h00 às 12h00, os animais foram utilizados uma única vez e, em seguida eutanasiados.

Todos os procedimentos experimentais foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB, sob a certidão n° 022/2017 (Anexo 1).

### 5.3. Substâncias utilizadas

- ✓ Dexametasona (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Etanol (Vetec – Brasil)
- ✓ Hidrocloreto R(+)-SCH23390 (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Imipramina (Norvartis Biociências – Brasil)
- ✓ Orto-eugenol (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Prazosin (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Ritanserina (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Sacarose (Sigma – E.U.A.)
- ✓ Solução salina 0,9% (ADV – Brasil)
- ✓ Tween 80 (polioxetileno sorbitano monoelato) (Sigma – E.U.A.)

### 5.4. Preparação do orto-eugenol e demais substâncias

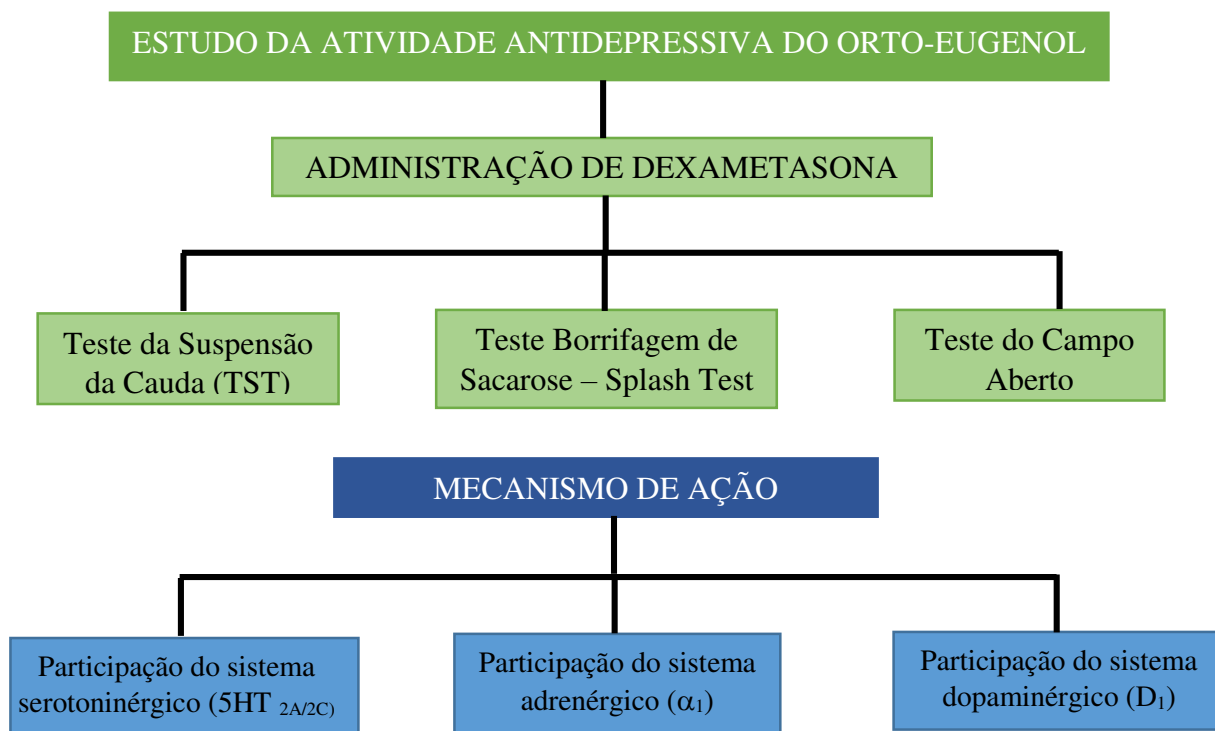
Imediatamente antes da realização dos testes, o orto-eugenol foi emulsificado em Tween 80 (Polissorbato 80) a 1% e em água destilada, utilizando concentrações decimais, de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10g de peso do animal.

O orto-eugenol foi preparado nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg (Fonsêca et al., 2016) para administração pela via intraperitoneal (i.p.). Como controle negativo, foi utilizado Tween 80 a 1% em água destilada (i.p.).

As demais substâncias, em suas respectivas doses, foram preparadas minutos antes de sua utilização, sendo dissolvidas em água destilada ou solução salina a 0,9%. Todas as substâncias foram administradas por via i.p. (orto-eugenol, salina, imipramina, prazosin e ritanserina) ou s.c. (dexametasona e SCH23390), e foram calculadas de forma a possibilitar a injeção de 0,1 mL/10g de peso do camundongo.

## 6. Método

O delineamento metodológico do estudo da atividade antidepressiva do orto-eugenol em camundongos está esquematizado na Figura 8.



**Figura 9** – Resumo esquemático das metodologias utilizadas no estudo do orto-eugenol.

### 6.1. Estudo da atividade antidepressiva

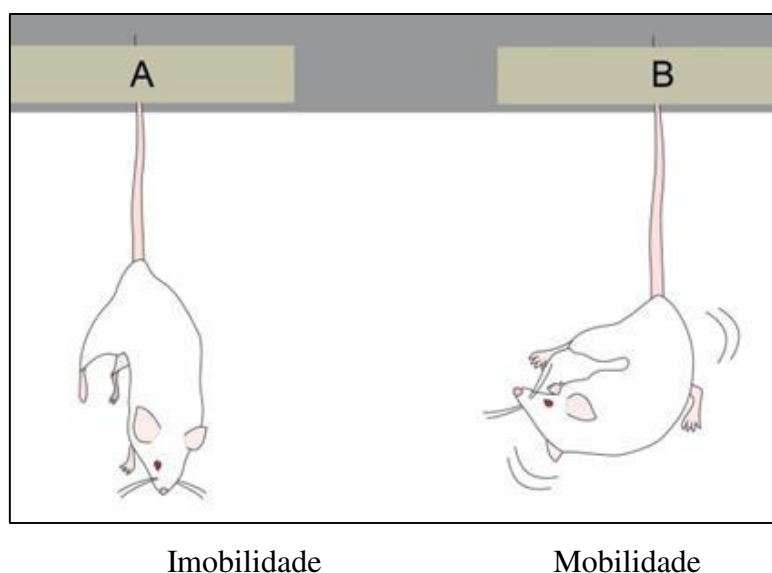
Para indução do comportamento depressivo nos camundongos, foi administrada a dexametasona. Esta é um glicocorticoide sintético e, de acordo com a literatura a administração de glicocorticoides em animais reproduz uma sintomatologia similar à da depressão através da disfunção do eixo HPA e da alteração do controle de *feedback* negativo (Lee, Shim, Lee, Yang & Hahm, 2009; Sterner & Kalynchuk, 2010; Crupi *et al.*, 2010).

O protocolo de indução do comportamento depressivo-símile foi adaptado de Wrobél e colaboradores (2014). A dexametasona (64µg/kg) foi administrada por via subcutânea em todos os grupos, com exceção do grupo salina, 3h30min antes da realização dos testes. Os experimentos foram concluídos até as 12h00, devido ao pico de liberação de corticosterona endógena. Os testes foram realizados na seguinte sequência: 1º Teste de Suspensão da Cauda; 2º Teste de Borrifagem de Sacarose; e 3º Teste do Campo Aberto.

### 6.1.1. Teste de Suspensão da Cauda

Este teste foi inicialmente proposto por Stéru e colaboradores (1985) e adaptado em nosso laboratório. Consiste em submeter o animal a uma situação estressante e inescapável, na qual ele irá apresentar dois tipos de comportamentos alternados: a agitação atribuída a tentativa de escape e a imobilidade. É um teste bastante empregado por ser de fácil aplicabilidade, e reprodutibilidade por conseguir detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (Cryan, Mombereau & Vassout, 2005; Nestler et al., 2002).

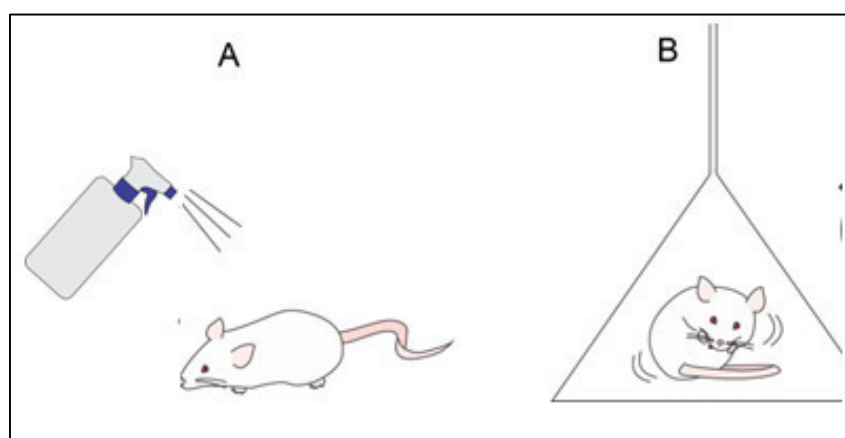
Para este procedimento seis grupos de 8 camundongos receberam por via i.p. os seguintes tratamentos: controle (salina 0,9% e Tween 80 a 1%), dexametasona (64µg/kg), orto-eugenol nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, e imipramina (10 mg/kg). Decorridos 30 minutos, os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda. O método consistiu em suspender os camundongos pela cauda a 50 cm do chão, com o auxílio de uma fita adesiva colocada a 1cm da ponta da cauda, na bancada de experimentos, de maneira tal que o animal permanecesse com a porção ventral do corpo voltada para a câmera de registros. Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min. Analisaram-se os seguintes parâmetros: latência para imobilidade e tempo total de imobilidade.



**Figura 10** - Representação dos comportamentos de imobilidade e mobilidade no TST. Fonte: Adaptado de Colla, 2015.

### 6.1.2. Teste de Borrifagem de Sacarose (Splash Test)

Neste experimento, foram utilizados grupos de oito camundongos tratados com controle (salina 0,9% e Tween 80 a 1%), dexametasona (64µg/kg), orto-eugenol nas doses 50, 75 e 100 mg/kg, e imipramina (10 mg/kg). Transcorridos 30 minutos, os animais foram borrifados no dorso com uma solução aquosa contendo 10% de sacarose (Figura 12A), seguida da alocação em caixas individuais e transparentes (Figura 12B). A solução, por ter uma textura viscosa, faz com que o animal tenha um comportamento de autolimpeza (*grooming*). Após a aplicação da solução de sacarose, foi contabilizado por um período de 5 minutos a latência para o início da autolimpeza (*grooming*) e o tempo total de autolimpeza (*grooming*), registrados com uma câmera. Esta reação observada nos animais é apontada como indicadora de autocuidado e comportamento motivacional, apresentando estreita relação com os sintomas da depressão, a exemplo do comportamento anedônico demonstrado pelos pacientes (Willner, 2005; Isingrini *et al.*, 2010; Moretti *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2014). Após a observação de cada animal, o aparato utilizado foi limpo com uma solução de 10% álcool.



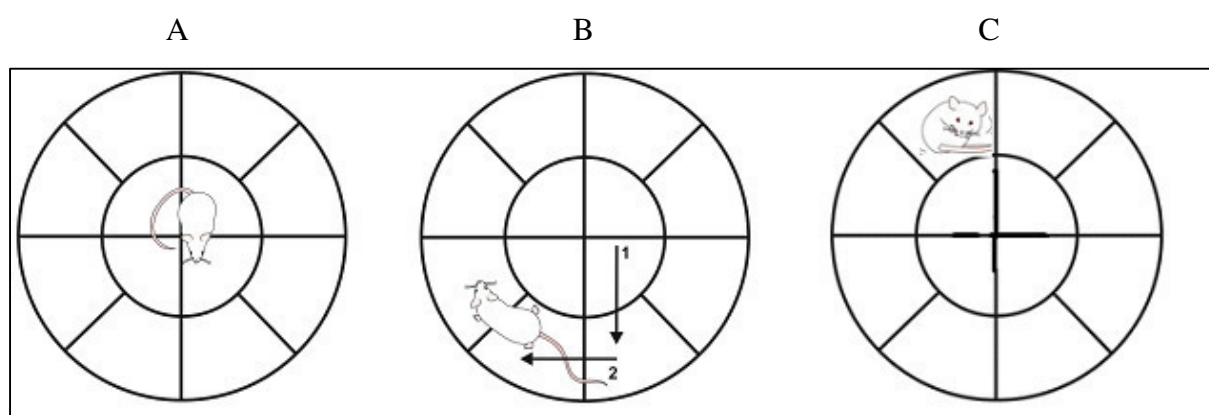
**Figura 11** – Teste de Borrifagem de Sacarose. A) A solução contendo 10% de sacarose e borrifada no dorso. B) Em seguida o animal é colocado no funil para a observação da autolimpeza. Fonte: Adaptado de Colla, 2015.

### 6.1.3. Teste do Campo Aberto

Originalmente descrito por Hall (1930) para testar o efeito de um ambiente estranho sobre o estado emocional de ratos, é um protocolo bastante utilizado para avaliar drogas ansiolíticas, também podendo ser aplicado para avaliar o efeito de drogas estimulantes, sedativas ou anticonvulsivantes sobre a atividade locomotora espontânea e comportamento

exploratório dos animais (Prut & Belzung, 2003). O aparato do campo aberto consiste em uma arena circular ( $40 \times 60 \times 50$  cm), com a base marcada em 12 quadrantes iguais.

Os camundongos foram separados em cinco grupos de 8 animais que receberam os tratamentos: controle (salina 0,9% e Tween 80 a 1%), dexametasona ( $64\mu\text{g/kg}$ ), orto-eugenol (50, 75 e  $100\text{ mg/kg i.p.}$ ) e imipramina ( $10\text{ mg/kg i.p.}$ ). Após 30 minutos os animais foram colocados no centro do campo aberto e foram contabilizados por um período de 5 minutos os seguintes parâmetros: a) número de cruzamentos entre os quadrantes (quando o animal atravessa colocando três patas); b) tempo total de permanência na periferia do aparato; c) tempo total de permanência no centro do aparato; c) quantidade de *rearing* (levantamentos) e, c) latência para o primeiro *rearing*. A base do aparelho foi limpa com solução de álcool 10% entre os animais (Almeida, 2006).



**Figura 12** - Teste do Campo Aberto. A) Tempo de permanência no centro. B) Cruzamento de quadrantes. C) *Rearing* (levantamento). Fonte: Adaptado de Colla, 2015.

## 6.2. Investigação dos possíveis mecanismos de ação na atividade antidepressiva do orto-eugenol

Após constatar que o orto-eugenol apresentou atividade antidepressiva nos testes descritos anteriormente, foram investigados os possíveis mecanismos de ação pelos os quais o orto-eugenol estaria causando o efeito encontrado. Estes estudos fundamentaram-se no uso de ferramentas farmacológicas que atuam em receptores específicos implicados na regulação do humor. Foram utilizados diferentes antagonistas em doses já descritas na literatura.

Para a realização desta investigação, foi escolhido o teste de suspensão da cauda, e a dose de  $50\text{ mg/kg}$  de orto-eugenol, pois foi a que obteve melhor desempenho nos modelos

selecionados. Todos os grupos, com exceção do grupo salina, receberam dexametasona (64µg/kg s.c.) 3h30min antes da realização do teste (Wróbel *et al.*, 2014).

#### 6.2.1. Avaliação do Sistema Dopaminérgico

A fim de investigar se o orto-eugenol exerce seu efeito antidepressivo através do sistema dopaminérgico, utilizou-se SCH-23390, um antagonista dos receptores D<sub>1</sub> (Can, Turan, Özkay & Öztürk, 2017).

Neste experimento, os animais também foram divididos em grupos distintos e tratados com veículo (Tween 80 1% i.p.), dexametasona (64µg/kg), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.) ou SCH-23390 (0,05 mg/kg s.c.). Outro grupo foi injetado inicialmente com SCH23390, e após 15 min recebeu o orto-eugenol, e após 30 minutos os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

#### 6.2.2. Avaliação do Sistema Serotoninérgico

A ritanserina, um antagonista seletivo de receptores 5HT<sub>2A/2C</sub> (Hu *et al.*, 2017) foi utilizada durante esta fase dos experimentos, como ferramenta farmacológica para a determinação do possível envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antidepressivo do orto-eugenol. Quatro grupos contendo 8 camundongos foram tratados com veículo (salina e Tween 80 à 1% i.p.), dexametasona (64µg/kg), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.) e ritanserina (4 mg/kg i.p.), respectivamente. Outro grupo foi pré-tratado com ritanserina (4 mg/kg i.p.) 30 minutos antes da administração do orto-eugenol (50 mg/kg i.p.). Transcorridos 30 minutos, os animais foram desafiados no teste de suspensão da cauda.

#### 6.2.3. Avaliação do Sistema Adrenérgico

Para investigação de um possível envolvimento do sistema noradrenérgico na resposta antidepressiva do orto-eugenol, utilizou-se o prazosin, um antagonista de receptores adrenérgicos α<sub>1</sub> (Abbasi-Maleki & Mousavi; Chellian, Pandey & Mohamed, 2016). Grupos de 8 camundongos foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), dexametasona (64µg/kg), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.) ou prazosin (1 mg/kg i.p.). Um outro grupo pré-



tratado, inicialmente, com prazosin, e após 15 min recebeu o orto-eugenol. Decorridos 30 minutos os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

### 6.3. Análise e Gravação dos Vídeos

Todos os testes comportamentais, foram gravados utilizando uma câmera digital Nikon Coolpix P520.

- ✓ Em seguida os vídeos foram editados pelos programas Adobe Premiere Pro C6® e Animotica – Vídeo Editor, de acordo com tempo de análise de cada teste;
- ✓ Uma voluntária, integrante do laboratório, fez a renomeação dos vídeos por meio de códigos;
- ✓ Após a renomeação dos vídeos, esses foram analisados de forma duplo cego.

### 6.4. Análise Estatística

O método de Análise de Variância *one-way* (ANOVA) foi aplicado na análise dos dados paramétricos, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet ou Tukey.

Os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), sendo as diferenças considerados significativas quando apresentassem um nível de significância  $p < 0,05$ .

Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

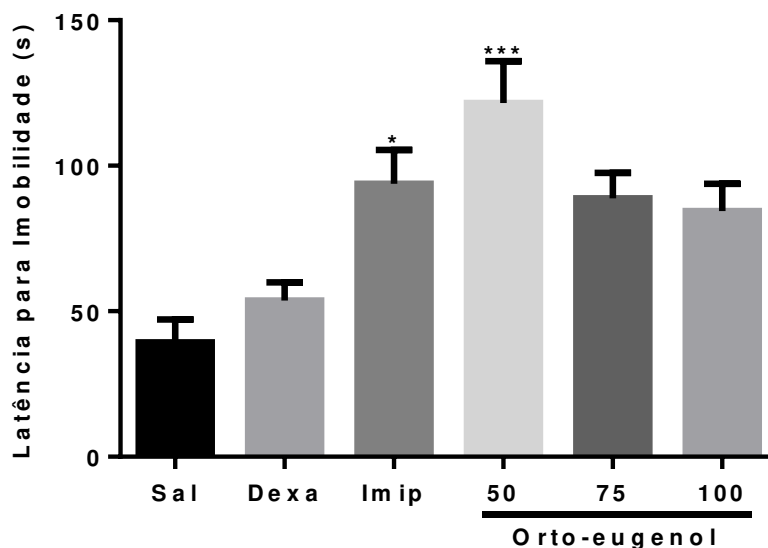
## 7. Resultados

### 7.1. Avaliação da atividade antidepressiva do orto-eugenol

#### 7.1.1. Efeito do orto-eugenol no Teste de Suspensão da Cauda

A ANOVA de uma via mostrou que existe efeito do pré-tratamento sobre a latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda [ $F(5, 42) = 8,634$ ;  $p < 0,0001$ ]. O *post-hoc* de Dunnett's mostrou que os animais tratados com orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $121,5 \pm 14,3$ ) e imipramina ( $93,7 \pm 11,7$ ), apresentaram uma maior latência para imobilidade quando comparados com o grupo Dexta ( $53,7 \pm 6,2$ ). Já o grupo orto-eugenol nas doses de 75 mg/kg ( $88,7 \pm 8,8$ ), 100 mg/kg ( $88,7 \pm 9,3$ ) e salina ( $39,2 \pm 7,9$ ) não apresentaram efeito significativo em comparação ao grupo Dexta (Gráfico 1).

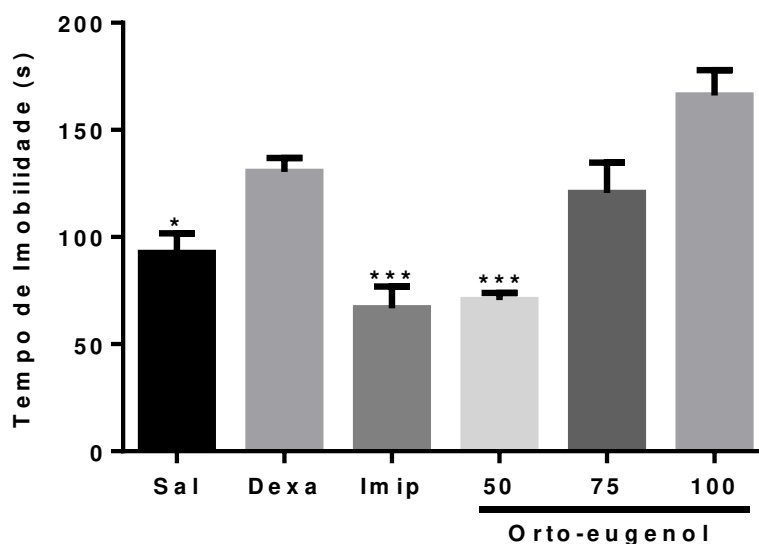
**Gráfico 1** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10 mg/kg) sobre a latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda.



Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus dexametasona.

Na avaliação do tempo de imobilidade (Gráfico 2), a ANOVA de uma via evidenciou que existe efeito do pré-tratamento [ $F(5, 42) = 15,19$ ;  $p < 0,0001$ ]. O *post-hoc* de Dunnett's demonstrou que os animais tratados com salina ( $92,5 \pm 9,1$ ), orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $70,6 \pm 3,3$ ), e imipramina ( $66,7 \pm 10,1$ ), diminuiram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo Dexta ( $130,4 \pm 6,56$ ). O orto-eugenol na dose de 75 mg/kg ( $120,5 \pm 14,2$ ) e 100 mg/kg ( $166,1 \pm 11,7$ ) não apresentaram efeito significativo em comparação ao grupo Dexta.

**Gráfico 2** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona ( $64\mu\text{g/kg}$ ) e imipramina (10 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda.

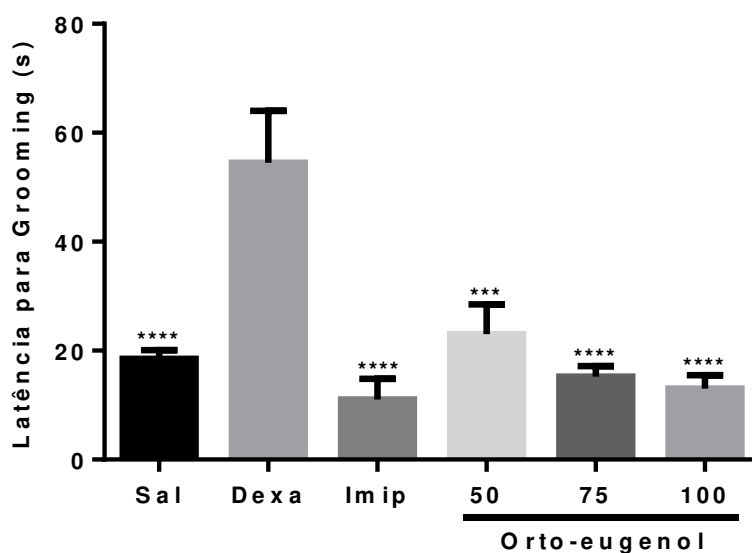


Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$   
 \*\*\* $p < 0,001$  versus dexametasona.

### 7.1.2. Efeito do orto-eugenol no Teste de Borrifagem de Sacarose – Splash Test

A ANOVA de uma via demonstrou que o pré-tratamento apresentou efeito sobre a latência para *grooming* (autolimpeza) [ $F(5, 42) = 10,60$ ;  $p < 0,0001$ ]. O *post-hoc* de Dunnett's mostrou que os grupos tratados com salina ( $18,5 \pm 1,5$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $23,0 \pm 5,4$ ), 75 mg/kg ( $15,25 \pm 1,9$ ), 100 mg/kg ( $13,0 \pm 2,4$ ) e imipramina ( $11,0 \pm 3,8$ ), diminuíram a latência para o *grooming* quando comparados ao grupo Dexa ( $54,5 \pm 9,56$ ).

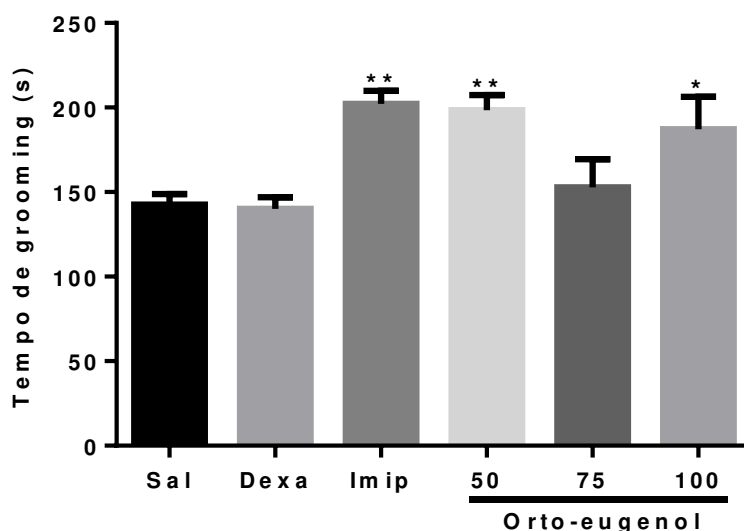
**Gráfico 3** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona ( $64\mu\text{g/kg}$ ) e imipramina (10 mg/kg) sobre a latência para *grooming* no teste de borrifagem de sacarose.



Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus dexametasona.

Os resultados obtidos para o tempo de *grooming* no teste de borrifagem de sacarose pode ser observados no Gráfico 4. A ANOVA de uma via comprovou que há o efeito do pré-tratamento sobre o tempo de autolimpeza [ $F(5, 42) = 6,334$ ;  $p = 0,0002$ ]. O *post-hoc* de Dunnett's mostrou que a administração intraperitoneal de orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $198,5 \pm 8,8$ ), 100 mg/kg ( $187,1 \pm 19,2$ ) e imipramina ( $202,3 \pm 7,6$ ), aumentaram o tempo de *grooming* quando comparados ao grupo Dexta ( $140,1 \pm 6,7$ ). O grupo salina ( $142,5 \pm 6,3$ ) e orto-eugenol na dose de 75 mg/kg ( $154,6 \pm 12,9$ ) não apresentaram diferenças estatísticas em comparação ao grupo Dexta.

**Gráfico 4** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10 mg/kg) sobre o tempo de *grooming* no teste de borrifagem de sacarose.

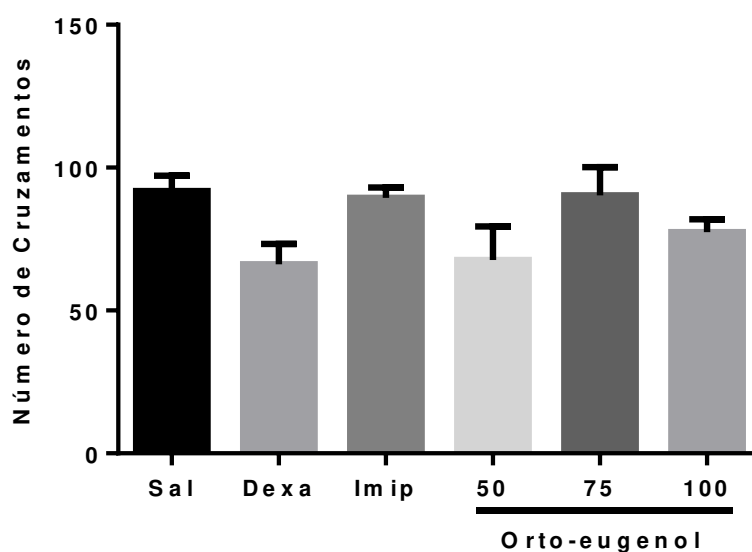


Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  versus dexametasona.

### 7.1.3. Efeito do orto-eugenol no Teste do Campo Aberto

Na avaliação do parâmetro número de cruzamentos dos animais no campo aberto, a ANOVA de uma via mostrou que não há efeito do pré-tratamento com salina ( $91,7 \pm 5,4$ ), Dexa ( $66,1 \pm 7,1$ ), imipramina ( $89,3 \pm 3,7$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $67,6 \pm 11,8$ ), 75 mg/kg ( $90,2 \pm 9,9$ ), e 100 mg/kg ( $77,3 \pm 4,5$ ) [ $F(5, 42) = 2,298$ ;  $p = 0,0621$ ].

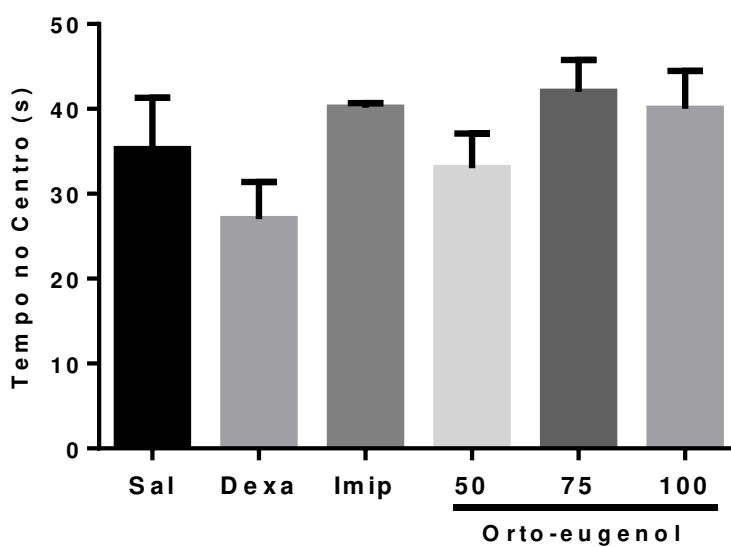
**Gráfico 5** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10 mg/kg) sobre o número de cruzamentos no teste do campo aberto.



Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.

No parâmetro tempo no centro do campo aberto, a ANOVA de uma via revelou que não existe efeito dos pré-tratamentos [ $F(5, 42) = 1,777$ ;  $p = 0,1386$ ] com salina ( $35,2 \pm 6,0$ ), Dexa ( $27,0 \pm 4,3$ ), imipramina ( $40,1 \pm 0,5$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $33,0 \pm 4,1$ ), 75 mg/kg ( $42,0 \pm 3,7$ ) e 100 mg/kg ( $40,0 \pm 4,4$ ) (Gráfico 6).

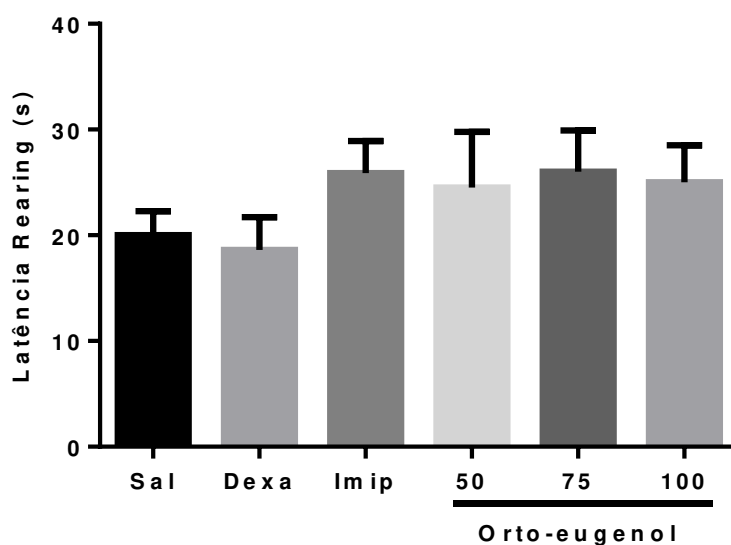
**Gráfico 6** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona ( $64\mu\text{g/kg}$ ) e imipramina (10 mg/kg) sobre o tempo no centro do campo aberto.



Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.

Na avaliação da latência para o *rearing* (Gráfico 7), a ANOVA de uma via mostrou que não há efeito dos pré-tratamentos com salina ( $20,0 \pm 2,2$ ), Dexa ( $18,6 \pm 3,0$ ), imipramina ( $25,8 \pm 3,0$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $24,5 \pm 5,2$ ), 75 mg/kg ( $26,0 \pm 3,9$ ) e 100 mg/kg ( $25,0 \pm 3,5$ ) [ $F(5, 42) = 0,7671$ ;  $p = 0,5787$ ].

**Gráfico 7** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona (64µg/kg) e imipramina (10 mg/kg) sobre a latência para o *rearing* no campo aberto.

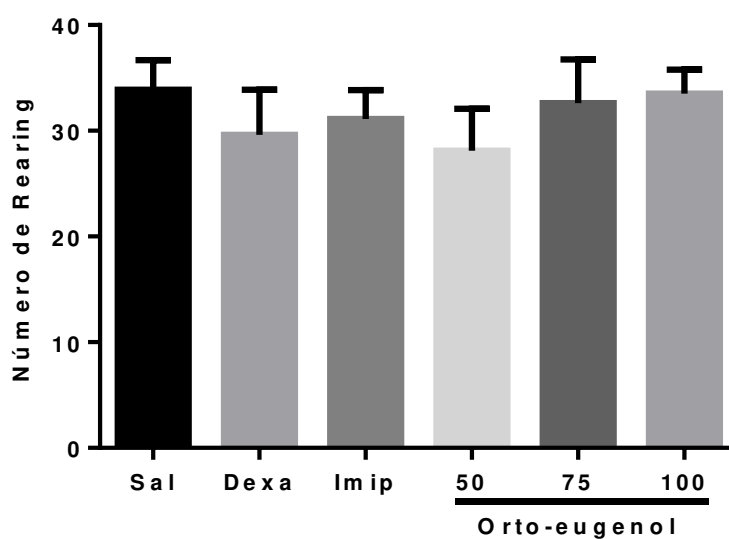


Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.



Na avaliação do número de *rearing* (Gráfico 8), a ANOVA de uma via mostrou que não existe efeito dos pré-tratamentos com salina ( $33,8 \pm 2,8$ ), Dexa ( $29,6 \pm 4,2$ ), imipramina ( $31,1 \pm 2,7$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $28,1 \pm 3,9$ ), 75 mg/kg ( $32,6 \pm 4,1$ ) e 100 mg/kg ( $33,5 \pm 2,2$ ) [ $F(5, 42) = 0,7671$ ;  $p = 0,5787$ ].

**Gráfico 8** – Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg), salina, dexametasona ( $64\mu\text{g/kg}$ ) e imipramina (10 mg/kg) sobre o número de *rearing* no campo aberto.

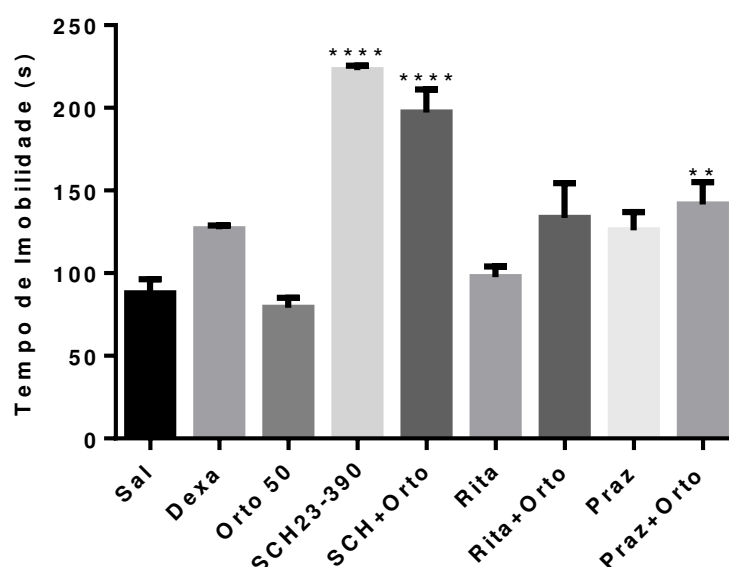


Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. ( $n=8$ ). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's.

## 7.2. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na antidepressiva do orto-eugenol

Os animais pré-tratados com SCH2330 ( $222,9 \pm 2,6$ ), SCH23390 + orto-eugenol ( $197,1 \pm 13,9$ ) e prazosin + orto-eugenol ( $141,5 \pm 13,6$ ), aumentaram o tempo de imobilidade quando comparados com orto-eugenol ( $79 \pm 6,1$ ) [ $F(8, 63) = 18,74$ ;  $p < 0,0001$ ]. A ritanserina ( $97,6 \pm 6,3$ ), ritanserina + orto-eugenol ( $133,4 \pm 21,15$ ), prazosin ( $126,0 \pm 11,0$ ) não apresentarem efeito significativo quando comparados com o orto-eugenol.

**Gráfico 9** – Efeito de antagonistas específicos na atividade antidepressiva do orto-eugenol no teste de suspensão da cauda.



Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey's. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus orto-eugenol.

## 8. Discussão

Nossos resultados indicaram que o orto-eugenol apresentou atividade antidepressiva nos testes de suspensão da cauda, por meio do aumento da latência para imobilidade e diminuição da imobilidade; no teste de borrifagem de sacarose diminuiu a latência para o *grooming* (autolimpeza) e aumentou o tempo de *grooming*; além de não alterar o número de cruzamentos, tempo no centro, latência e número de *rearing* no teste do campo aberto.

O protocolo de indução do comportamento tipo depressivo por dexametasona é fundamentado na literatura, apresentando validade de face (mimetiza sintomas associados à doença), de constructo (desenvolve aspectos fisiopatológicas análogos à condição humana) e validade preditiva (o tratamento com antidepressivos pode reverter as alterações do modelo) (Mckinney & Bunney 1969; Li *et al.*, 2014; Wróbel *et al.*, 2014, 2015; Conti, Spulber, Raciti & Ceccatelli, 2017). A dexametasona é um glicocorticoide sintético, e diversos estudos tem confirmado que a exposição a curto ou longo prazo induzem comportamento depressivo em roedores (Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006; Silva *et al.*, 2013; Skupio *et al.*, 2014; Wróbel *et al.*, 2014, 2015).

A dexametasona causa alterações comportamentais nos animais, similares a depressão, por aumentar o nível de cortisol circulante, que se ligará aos receptores glicocorticoides, causando a inibição da secreção CRH e ACTH, levando a uma hiperestimulação do eixo HPA. O cortisol em níveis elevados provoca efeitos neurais excitotóxicos, que são observados em pacientes com transtorno depressivo (Martino, 2014).

Nossos resultados evidenciam a eficácia do modelo de estresse induzido pela dexametasona, visto que sua administração aguda foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos animais comparado ao grupo controle no teste de suspensão da cauda, produzindo um comportamento depressivo-símile.

O teste de suspensão da cauda é um dos modelos mais utilizados para a triagem de novas drogas antidepressivas, é relativamente sensível e específico para grande parte das classes de medicamentos antidepressivos. É baseado na premissa de que o animal quando colocado diante de situação inescapável, preso pela cauda, desenvolve uma postura de imobilidade após tentativas iniciais de fuga. E tal situação é percebida como uma desistência, sendo descrita como um estado depressivo. As substâncias antidepressivas reverterem esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade (Willner & Mitchell, 2002; Holmes, 2003; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985).

Corroborando os nossos resultados, Li e colaboradores (2014) demonstraram que o protocolo da dexametasona aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda quando comparada ao grupo controle. No entanto, o protocolo de tratamento e as doses da dexametasona foram diferentes das utilizada em nosso trabalho. Os pesquisadores administraram a dexametasona durante o período neonatal (1-3 dias) em doses variando de 0,1 - 0,5 mg/kg de peso.

Wróbel e colaboradores (2014, 2015) encontraram um aumento no tempo imobilidade dos camundongos machos submetidos a injeções em dose única de dexametasona (64 µg/kg), no teste do nado forçado, similarmente Sigwalt *et al.* (2011), encontrou o mesmo resultado administrando em ratos uma dose maior de dexametasona (1,5 mg/kg). Vale salientar que o teste do nado forçado (TNF) tem o mesmo fundamento do teste de suspensão da cauda e, os de antidepressivos respondem bem ao dois testes.

De acordo com resultados, o orto-eugenol na dose de 50 mg/kg apresentou atividade antidepressiva no modelo de depressão induzido por dexametasona, por meio da diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Tal resultado se assemelha ao da imipramina, o antidepressivo utilizado como droga padrão, que também diminuiu o tempo de imobilidade.

Similar aos nossos achados, o eugenol apresentou atividade antidepressiva por meio do teste de suspensão da cauda, causando uma diminuição do tempo de imobilidade na dose de 100 mg/kg (Irie et al., 2004). Em outro estudo, a Riparina III demonstrou efeito antidepressivo no modelo de depressão induzido por corticosterona em camundongos fêmeas, diminuindo o tempo de imobilidade no TST (Vasconcelos *et al.*, 2015). Outrossim, Mao e colaboradores (2014) evidenciaram que a Piperina, um alcaloide da pimenta preta e longa, causou uma diminuição do tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao protocolo da corticosterona durante 3 semanas.

Na análise do parâmetro latência para imobilidade no teste de suspensão da cauda, o orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg e 75 mg/kg aumentaram a latência, reforçando a atividade antidepressiva da substância. A análise deste parâmetro é pouco utilizada em estudos, porém é um dado relevante para avaliar ainda mais os efeitos de drogas, visto que certas classes de antidepressivos alteram a latência. A verificação deste comportamento serve para melhorar a validade preditiva de testes de desespero comportamental (Castagné, Porsolt & Moser, 2009; Castagné, Moser, Roux & Porsolt, 2010).

Em pacientes com o transtorno depressivo, um dos sintomas identificados é a anedonia. Caracterizada pela perda interesse ou prazer para realizar atividades, sendo critérios necessários para o diagnóstico da doença (Kendler, Muñoz & Murphy, 2010; Gaillard, Gurion & Liorca, 2013). Aliado com o teste de suspensão da cauda, pode-se avaliar a anedonia, utilizando-se o teste de borrifagem de sacarose. O qual representa um resultado comportamental válido, dado que os animais submetidos a modelos comportamentais de depressão exibem um menor tempo de *grooming* (autolimpeza) em relação aos animais controle, sendo interpretado com um comportamento anedônico. Em contrapartida, a administração de antidepressivos clássicos aumenta o tempo gasto neste comportamento (Kalueff, 2002; Kalueff & Tuohimaa, 2004; Moretti et al., 2012; Yalcin, Aksu & Belzung 2005).

Os resultados obtidos no teste de borrifagem de sacarose mostram que houve um aumento na latência para o *grooming* no grupo DEXA, já o orto-eugenol nas três doses e a imipramina diminuíram a latência. No parâmetro tempo de *grooming* o orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg e 100mg/kg aumentaram o tempo de *grooming*, apresentando um efeito equivalente ao da droga padrão imipramina. Esses resultados associados com os do teste de suspensão da cauda, sugerem que o orto-eugenol apresenta uma relevante atividade antidepressiva.

No estudo realizado por Zeni, Camargo e Ana (2017), o ácido ferúlico, um composto fenólico presente em várias espécies de plantas, elevou o tempo de *grooming* de camundongos machos submetidos ao protocolo da corticosterona (20 mg/kg) administrada por via oral durante 21 dias. Na mesma linha, Borges Filho e colaboradores (2016), encontram que a administração de crisina, um flavonoide encontrado no própolis e mel, também aumentou o tempo de *grooming* de camundongos fêmeas que passaram por estresse crônico imprevisível durante 28 dias. O modelo de estresse crônico imprevisível, assim como o modelo da DEXA, induz um comportamento depressivo-símile nos animais, provocando alterações neuroquímicas e neuroestruturais.

Diferentemente do nosso resultado, a administração única de agmatina, um neuromodulador endógeno, por via oral em camundongos fêmeas após 14 dias de estresse crônico imprevisível, não alterou a latência nem o tempo de *grooming* (Neis et al., 2016). Já em outro estudo, a administração repetida de melatonina em ratos durante 10 dias de estresse subcrônico por restrição aumentou a latência para o *grooming* similarmente à droga antidepressiva padrão fluoxetina (Li et al., 2017).

O teste do campo aberto é largamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea e fornece indícios do estado emocional dos roedores (Rodrigues, Rocha, Mello & Souza, 1996; Choleris, Thomas, Kavaliers & Prato, 2001; Prut & Belzung, 2003).

O grupo DEXA apresentou uma diminuição no número de cruzamentos e no número de *rearing* em relação ao grupo salina. Porém, não alterou a porcentagem de tempo no centro, a latência para o *rearing*. Os comportamentos observados são sugestivos de um efeito ansiogênico da DEXA, evidenciando uma relação com sua atividade depressora.

Por meio do número de cruzamentos no teste do campo aberto ficou demonstrado que nem o orto-eugenol, imipramina ou dexametasona são drogas que alteram a atividade locomotora dos animais. Esse resultado descarta a possibilidade de que, o parâmetro tempo de imobilidade no TST, os animais estejam respondendo devido a uma ação sedativa ou estimulante, visto que o tratamento com dexametasona aumenta o tempo de imobilidade dos animais, enquanto orto-eugenol e imipramina diminuem. Corroborando os nossos achados, estudos com a administração de dexametasona e corticosterona não encontraram alteração no número de cruzamentos (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005; Marks, Fournier & Kalynchuk, 2009; Skupio *et al.*, 2015).

A avaliação da atividade locomotora do animal no centro do campo aberto é uma medida mais seletiva de ansiedade (Gorisch & Schwarting 2006; Kuleshkaya & Voikar, 2014). Outro parâmetro como o número de *rearing* também é analisado. Dessa forma, notou-se que a administração de orto-eugenol, imipramina e dexametasona não alterou a latência e o número de *rearing*.

Levando em consideração a grande aceitação do teste de suspensão da cauda como forma de investigação de drogas antidepressivas, ele foi para escolhido investigar os possíveis mecanismos de ação do orto-eugenol na dose 50 mg/kg, tendo sido esta dose que apresentou efeito antidepressivo mais pronunciado nos testes realizados. Foram investigados três vias de mecanismos: via dopaminérgica, serotoninérgica e adrenérgica.

A literatura evidencia que o sistema dopaminérgico está estritamente envolvido na regulação do humor (Dailly, Chenu, Renard & Bourin, 2004), e a desregulação da via dopaminérgica mesolímbica e mesocortical está relacionada com os sinais de melancolia e de cognição da depressão (Millan *et al.*, 2000; Naranjo, Tremblay & Busto 2001; Lehr, 2002). Existe uma quantidade relevante de evidências farmacológicas sobre a efetividade dos

antidepressivos que atuam na via dopaminérgica no tratamento da depressão (Papakosta, 2006).

Os resultados mostram que o sistema dopaminérgico está envolvido no potencial efeito antidepressivo do orto-eugenol, visto que o pré-tratamento dos camundongos com SCH23390 (antagonista de receptores  $D_1$ ), reverteu o efeito antidepressivo induzido pelo orto-eugenol, aumentando o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda. Assim como, no grupo tratado apenas com SCH23390, aumentou este parâmetro. Estes resultados estão de acordo com o encontrado por Can e colaboradores (2017), que ao administrarem SCH23390 em camundongos, reverteram o efeito antidepressivo do ácido gálico no teste da suspensão da cauda. Machado e colaboradores, também evidenciaram a participação dos receptores  $D_1$  no efeito antidepressivo do extrato de *Rosmarinus officinalis*, o qual foi revertido pelo o pré-tratamento com SCH23390 no mesmo teste.

Outro sistema envolvido na fisiopatologia da depressão é o adrenérgico, e estudos tem evidenciado a ocorrência de uma hipofunção desse sistema, e alguns antidepressivos agem aumentando a disponibilidade sináptica de noradrenalina (Brunello *et al.*, 2003; Nutt, 2006). Foi constatado que os receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos estão implicados nas respostas de drogas antidepressivas em modelos comportamentais de depressão (Kitada, Miyauchi, Kanazawa, Nakamichi & Satoh, 1983; Masuda, Ohnuma & Sugiyama, 2001).

Em nossos achados, o prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), quando administrado sozinho não apresentou diferença significativa sobre o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Mas quando os animais foram pré-tratados com o prazosin e depois com o orto-eugenol, aumentaram o tempo de imobilidade. Chellian, Pandey e Mohamed (2016) evidenciaram que o  $\alpha$ -asarone, um análogo estrutural do eugenol, teve seu efeito antidepressivo em camundongos revertido pelo pré-tratamento com prazosin no teste da suspensão da cauda.

A alteração do funcionamento do sistema serotoninérgico tem sido extensivamente implicada na etiologia da depressão e no mecanismo de ação de drogas antidepressivas (Millan, 2004). As principais evidências relacionadas com o alívio da depressão envolvem fármacos com efeitos sobre o aumento das concentrações sinápticas de serotonina (Cryan, Valentino & Lucki 2005).

No presente trabalho, o orto-eugenol não teve o tempo de imobilidade alterado pelo pré-tratamento com a ritanserina, evidenciando que seu efeito antidepressivo não é modulado por receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/2C</sub>. Similarmente, o estudo realizado por Hu e

colaboradores (2017) encontraram que o pré-tratamento com ritanserina não alterou o efeito no tempo de imobilidade do Genistein no teste da suspensão da cauda.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a administração de orto-eugenol em camundongos fêmeas submetidos ao modelo de depressão induzido por dexametasona produziu um efeito antidepressivo relevante, sendo este associado com o envolvimento do sistema dopaminérgico D1,  $\alpha_1$ -adrenérgico.



## 9. Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos com as metodologias utilizadas em camundongas fêmeas, foi possível concluir que:

- Foi mimetizado o comportamento depressivo-símile associado ao estresse pelo modelo da administração aguda de dexametasona em camundongos fêmeas, observada por meio dos testes realizados;
- O orto-eugenol apresentou atividade antidepressiva, principalmente na dose de 50 mg/kg no modelo de depressão induzida pela dexametasona.
- O orto-eugenol e a dexametasona não alteraram a atividade locomotora dos animais no campo aberto.
- O efeito antidepressivo do orto-eugenol parece estar envolvido com os sistemas dopaminérgico  $D_1$  e  $\alpha_1$  adrenérgico.

## **10. Perspectivas**

Apesar dos nossos achados sugerirem uma possível alternativa terapêutica, muito ainda há para desvendar sobre os reais efeitos do orto-eugenol no tratamento da depressão, bem como para outras enfermidades.

Investigações acerca do tratamento crônico, abordando diferenças entre sexo, investigar os mecanismos moleculares e neuroquímicos, entre outras possibilidades, tendo em vista ser uma substância pouco pesquisada e potencialmente promissora.

## 11. Referências

- Abbasi-Maleki, S., & Mousavi, Z. (2017). Hydroethanolic extract of *Carthamus tinctorius* induces antidepressant-like effects: modulation by dopaminergic and serotonergic systems in tail suspension test in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*, 20(9), 1063.
- Almeida, R. N. D. (2006). *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Aguilera, G., Kiss, A., Liu, Y., & Kamitakahara, A. (2007). Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress*, 10(2), 153-161.
- Amaral, J. F., Silva, M. I. G., de Aquino Neto, M. R., Moura, B. A., de Carvalho, A. M. R., Vasconcelos, P. F., ... & de Sousa, F. C. F. (2013). Antidepressant-like effect of bis-eugenol in the mice forced swimming test: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5), 471-482.
- American Psychiatric Association. (2017, April). *What is Depression?*. Recuperado em 11 de fevereiro, 2018, do <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>
- American Psychiatric Association. (2014). *Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: texto revisado (DSM-V-TR)*. Artmed.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Barbosa, F. M., Cabral, D., Kabadayan, F., Bondan, E. F., Martins, M. D. F. M., Kirsten, T. B., ... & Saraceni, C. H. C. (2017). Depressive behavior induced by unpredictable chronic mild stress increases dentin hypersensitivity in rats. *Archives of oral biology*, 80, 164-174.
- Blanco, M. M., Costa, C. A. R. A., Freire, A. O., Santos Jr, J. G., & Costa, M. (2009). Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine*, 16(2-3), 265-270.
- Black, C. N., Bot, M., Scheffer, P. G., Cuijpers, P., & Penninx, B. W. (2015). Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 51, 164-175.
- Berlim, M. T., & Turecki, G. (2007). What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. *European Neuropsychopharmacology*, 17(11), 696-707.
- Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(2), 137.

- Bilgen, A. E., Zincir, S. B., Zincir, S., Özdemir, B., Ak, M., Aydemir, E., & Şener, İ. (2014). Effects of electroconvulsive therapy on serum levels of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in treatment resistant major depression. *Brain research bulletin*, 104, 82-87.
- Borges Filho, C., Jesse, C. R., Donato, F., Del Fabbro, L., de Gomes, M. G., Goes, A. T. R., ... & Roman, S. S. (2016). Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. *European journal of pharmacology*, 791, 284-296.
- Brunello, N., Blier, P., Judd, L. L., Mendlewicz, J., Nelson, C. J., Souery, D., ... & Racagni, G. (2003). Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. *International clinical psychopharmacology*, 18(4), 191-202.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
- Bumb, J. M., Aksay, S. S., Janke, C., Kranaster, L., Geisel, O., Gass, P., ... & Sartorius, A. (2015). Focus on ECT seizure quality: serum BDNF as a peripheral biomarker in depressed patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 265(3), 227-232.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Bus, B. A. A., & Molendijk, M. L. (2016). De neurotrofe hypothese van depressie. *Tijdschrift voor psychiatrie*, 58(3), 215-222.
- Can, Ö. D., Turan, N., Özkay, Ü. D., & Öztürk, Y. (2017). Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. *Life sciences*, 190, 110-117.
- Carrasco, G. A., & Van de Kar, L. D. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 235-272.
- Carlini, E. A. (2003). Plants and the central nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 501-512.
- Charney, D. S. (2004). Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability. *Focus*
- Chellian, R., Pandey, V., & Mohamed, Z. (2016). Biphasic effects of  $\alpha$ -asarone on immobility in the tail suspension test: evidence for the involvement of the noradrenergic and serotonergic systems in its antidepressant-like activity. *Frontiers in pharmacology*, 7, 72.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.

- Chopra, K., Kumar, B., & Kuhad, A. (2011). Pathobiological targets of depression. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(4), 379-400.
- Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Geddes, J. R., Higgins, J. P., Churchill, R., ... & Tansella, M. (2009). Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *The lancet*, 373(9665), 746-758.
- Clayton, A. H., Pradko, J. F., Croft, H. A., Montano, C. B., Leadbetter, R. A., Bolden-Watson, C., ... & Metz, A. (2002). Prevalence of sexual dysfunction among newer antidepressants. *The Journal of clinical psychiatry*.
- Coelho-de-Souza, A. N., Lahlou, S., Barreto, J. E., Yum, M. E., Oliveira, A. C., Oliveira, H. D., ... & de Albuquerque, A. A. (2013). Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(3), 288-298.
- Conti, M., Spulber, S., Raciti, M., & Ceccatelli, S. (2017). Depressive-like phenotype induced by prenatal dexamethasone in mice is reversed by desipramine. *Neuropharmacology*, 126, 242-249.
- Colla, A. R. S. (2015). *Efeito tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico do ácido ursólico em camundongos em diferentes modelos animais* (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, SC, Brasil.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547-569.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 571-625.
- Craveiro, A. A. (1981). *Óleos essenciais de plantas do Nordeste* (Vol. 1). Edições UFC.
- Crupi, R., Mazzon, E., Marino, A., La Spada, G., Bramanti, P., Cuzzocrea, S., & Spina, E. (2010). Melatonin treatment mimics the antidepressant action in chronic corticosterone-treated mice. *Journal of pineal research*, 49(2), 123-129.
- Cunha, C., Brambilla, R., & Thomas, K. L. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory?. *Frontiers in molecular neuroscience*, 3, 1.
- Dailly, E., Chenu, F., Renard, C. E., & Bourin, M. (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & clinical pharmacology*, 18(6), 601-607.
- Dal Bó, W., Luiz, A. P., Martins, D. F., Mazzardo-Martins, L., & Santos, A. R. (2013). Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) pathways. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5), 517-525.
- Dhir, A., & Kulkarni, S. K. (2011). Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*, 24(3), 125-131.

- Douma, S. L., Husband, C., O'donnell, M. E., Barwin, B. N., & Woodend, A. K. (2005). Estrogen-related mood disorders: Reproductive life cycle factors. *Advances in Nursing Science*, 28(4), 364-375.
- Drapier, D., Bentué-Ferrer, D., Laviolle, B., Millet, B., Allain, H., Bourin, M., & Reymann, J. M. (2007). Effects of acute fluoxetine, paroxetine and desipramine on rats tested on the elevated plus-maze. *Behavioural brain research*, 176(2), 202-209.
- Drevets, W. C. (2000). Neuroimaging studies of mood disorders. *Biological psychiatry*, 48(8), 813-829.
- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological psychiatry*, 59(12), 1116-1127.
- Duman, C. H. (2010). Models of depression. In *Vitamins & Hormones* (Vol. 82, pp. 1-21). Academic Press.
- Ebmeier, K. P., Donaghey, C., & Steele, J. D. (2006). Recent developments and current controversies in depression. *The Lancet*, 367(9505), 153-167.
- Ehrmann, E. H., Messer, H. H., & Adams, G. G. (2003). The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. *International endodontic journal*, 36(12), 868-875.
- Görisch, J., & Schwarting, R. K. (2006). Wistar rats with high versus low rearing activity differ in radial maze performance. *Neurobiology of learning and memory*, 86(2), 175-187.
- Gregus, A., Wintink, A. J., Davis, A. C., & Kalynchuk, L. E. (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioural brain research*, 156(1), 105-114.
- Escobar, R. G. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista cubana de Estomatología*, 39(2), 139-156.
- Esplugues, J. V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous system. *British journal of pharmacology*, 135(5), 1079-1095.
- Ferrari, F., & Villa, R. F. (2017). The neurobiology of depression: an integrated overview from biological theories to clinical evidence. *Molecular neurobiology*, 54(7), 4847-4865.
- Finkel, M. S., Laghrissi-Thode, F., Pollock, B. G., & Rong, J. (1996). Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacology bulletin*.
- Fonsêca, D. V., Salgado, P. R., Neto, H. D. C. A., Golzio, A. M., Caldas Filho, M. R., Melo, C. G., ... & Almeida, R. N. (2016). Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *International immunopharmacology*, 38, 402-408.
- Franchome, P., Penoel, D. (1995). *L'Aromathérapie Exactement: Encyclopedie de l'Utilisation Thérapeutique des Huiles Essentielles*. Roger Jollois Edition, Limoges, France.

- Frisch, J., & Bhaskar, S. N. (1967). Tissue response to eugenol-containing periodontal dressings. *Journal of periodontology*, 38(5), 402-408.
- Fuchs, E., & Flügge, G. (2005). Depressionen: Eine Störung der Neuroplastizität?. *psychoneuro*, 31(04), 197-203.
- Geuze, E. E. J. D., Vermetten, E., & Bremner, J. D. (2005). MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, 10(2), 160.
- Goncharova, N. D. (2013). Stress responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: age-related features of the vasopressinergic regulation. *Frontiers in endocrinology*, 4, 26.
- Grover, S., Dutt, A., & Avasthi, A. (2010). An overview of Indian research in depression. *Indian journal of psychiatry*, 52(Suppl1), S178.
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology*, 18(3), 385
- Hamilton, J. P., Siemer, M., & Gotlib, I. H. (2008). Amygdala volume in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Molecular psychiatry*, 13(11), 993.
- Han, P., Han, T., Peng, W., & Wang, X. R. (2013). Antidepressant-like effects of essential oil and asarone, a major essential oil component from the rhizome of *Acorus tatarinowii*. *Pharmaceutical biology*, 51(5), 589-594.
- Herbert, J., Goodyer, I. M., Grossman, A. B., Hastings, M. H., De Kloet, E. R., Lightman, S. L., ... & Seckl, J. R. (2006). Do corticosteroids damage the brain?. *Journal of neuroendocrinology*, 18(6), 393-411.
- Hertting, G., Axelrod, J., & Whitby, L. G. (1961). Effect of drugs on the uptake and metabolism of H3-norepinephrine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 134(2), 146-153.
- Hillhouse, T. M., & Porter, J. H. (2015). A brief history of the development of antidepressant drugs: From monoamines to glutamate. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 23(1), 1.
- Holmes, P. V. (2003). Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 15(2).
- Hu, P., Ma, L., Wang, Y. G., Ye, F., Wang, C., Zhou, W. H., & Zhao, X. (2017). Genistein, a dietary soy isoflavone, exerts antidepressant-like effects in mice: Involvement of serotonergic system. *Neurochemistry international*, 108, 426-435.
- Hu, Y., Yu, X., Yang, F., Si, T., Wang, W., Tan, Y., ... & Chen, D. (2010). The level of serum brain-derived neurotrophic factor is associated with the therapeutic efficacy of modified electroconvulsive therapy in Chinese patients with depression. *The journal of ECT*, 26(2), 121-125.

- Huang, C., Li, W. G., Zhang, X. B., Wang, L., Xu, T. L., Wu, D., & Li, Y. (2013). Alpha-asarone from *Acorus gramineus* alleviates epilepsy by modulating A-type GABA receptors. *Neuropharmacology*, 65, 1-11.
- Jones, H. A., & Haller, H. L. (1940). Bieugenol in a Commercial Geraniol. *Journal of the American Chemical Society*, 62(9), 2558-2559.
- Johnson, S. A., Fournier, N. M., & Kalynchuk, L. E. (2006). Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioural brain research*, 168(2), 280-288.
- Kalueff, A. V. (2002). Grooming and stress. *M: Avix*.
- Kalueff, A. V., & Tuohimaa, P. (2004). Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols*, 13(3), 151-158.
- Kendler, K. S., Sheth, K., Gardner, C. O., & Prescott, C. A. (2002). Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. *Psychological medicine*, 32(7), 1187-1194.
- Kern, N., Sheldrick, A. J., Schmidt, F. M., & Minkwitz, J. (2012). Neurobiology of depression and novel antidepressant drug targets. *Current pharmaceutical design*, 18(36), 5791-5801.
- Kim, K. S., & Han, P. L. (2006). Optimization of chronic stress paradigms using anxiety-and depression-like behavioral parameters. *Journal of neuroscience research*, 83(3), 497-507.
- Kitada, Y., Miyauchi, T., Kanazawa, Y., Nakamichi, H., & Satoh, S. (1983). Involvement of  $\alpha$ - and  $\beta$ 1-adrenergic mechanisms in the immobility-reducing action of desipramine in the forced swimming test. *Neuropharmacology*, 22(9), 1055-1060.
- Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine reviews*, 19(3), 269-301.
- Koolhaas, J. M., Bartolomucci, A., Buwalda, B. D., De Boer, S. F., Flügge, G., Korte, S. M., ... & Richter-Levin, G. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5), 1291-1301.
- Koolschijn, P. C. M. P., van Haren, N. E., Lensvelt-Mulders, G. J., Pol, H., Hilleke, E., & Kahn, R. S. (2009). Brain volume abnormalities in major depressive disorder: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Human brain mapping*, 30(11), 3719-3735.
- Kozam, G. (1977). The effect of eugenol on nerve transmission. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 44(5), 799-805.
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894.
- Kuleshkaya, N., & Voikar, V. (2014). Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. *Physiology & behavior*, 133, 30-38.



- Kurkin, V. A. (2003). Phenylpropanoids from medicinal plants: distribution, classification, structural analysis, and biological activity. *Chemistry of natural compounds*, 39(2), 123-153.
- Kyrou, I., & Tsigos, C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current opinion in pharmacology*, 9(6), 787-793.
- Leal-Cardoso, J. H., Matos-Brito, B. G., Lopes-Junior, J. E. G., Viana-Cardoso, K. V., Sampaio-Freitas, A. B., Brasil, R. O., ... & Albuquerque, A. A. C. (2004). Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8), 1193-1198.
- Lee, B., Shim, I., Lee, H. J., Yang, Y., & Hahm, D. H. (2009). Effects of acupuncture on chronic corticosterone-induced depression-like behavior and expression of neuropeptide Y in the rats. *Neuroscience Letters*, 453(3), 151-156.
- Lesch, K. P. (2004). Gene–environment interaction and the genetics of depression. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 29(3), 174.
- Lehr, E. (2002). Potential antidepressant properties of pramipexole detected in locomotor and operant behavioral investigations in mice. *Psychopharmacology*, 163(3-4), 495-500.
- Li, S. X., Fujita, Y., Zhang, J. C., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., & Hashimoto, K. (2014). Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiology of disease*, 62, 124-134.
- Li, K., Shen, S., Ji, Y. T., Li, X. Y., Zhang, L. S., & Wang, X. D. (2017). Melatonin Augments the Effects of Fluoxetine on Depression-Like Behavior and Hippocampal BDNF–TrkB Signaling. *Neuroscience bulletin*, 1-9.
- Liu, S., Chen, S. W., Xu, N., Liu, X. H., Zhang, H., Wang, Y. Z., Xiao Dan Xu, X. D. (2012). Anxiolytic-like Effect of  $\alpha$ -Asarone in Mice. *Phytotherapy Research*, 26(10), 1476-1481.
- Lukas, G., Brindle, S. D., & Greengard, P. (1971). The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 178(3), 562-566.
- Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Rodrigues, A. L. S. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(4), 642-650.
- Mao, Q. Q., Huang, Z., Zhong, X. M., Xian, Y. F., & Ip, S. P. (2014). Piperine reverses the effects of corticosterone on behavior and hippocampal BDNF expression in mice. *Neurochemistry international*, 74, 36-41.
- Makkar, H. P. S., Francis, G., & Becker, K. (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 1(9), 1371-1391.

- Malykhin, N. V., & Coupland, N. J. (2015). Hippocampal neuroplasticity in major depressive disorder. *Neuroscience*, 309, 200-213.
- Marks, W., Fournier, N. M., & Kalynchuk, L. E. (2009). Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiology & behavior*, 98(1-2), 67-72.
- Martino, P. (2014). Un análisis de las estrechas relaciones entre el estrés y la depresión desde la perspectiva psiconeuroendocrinológica: el rol central del cortisol. *Cuadernos de Neuropsicología*, 8(1), 60-75.
- Masuda, Y., Ohnuma, S., & Sugiyama, T. (2001).  $\alpha$ 2-adrenoceptor activity induces the antidepressant-like glycolipid in mouse forced swimming. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, 23, 19-21.
- Mayaud, L., Carricajo, A., Zhiri, A., & Aubert, G. (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Letters in applied microbiology*, 47(3), 167-173.
- Mao, Q. Q., Huang, Z., Ip, S. P., Xian, Y. F., & Che, C. T. (2012). Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats. *Behavioural brain research*, 227(1), 305-309.
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annual review of neuroscience*, 22(1), 105-122.
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biological psychiatry*, 65(9), 732-741.
- Millan, M. J., Lejeune, F., Gobert, A., Brocco, M., Auclair, A., Bosc, C., ... & Dekeyne, A. (2000). S18616, a highly potent spiroimidazoline agonist at  $\alpha$ 2-adrenoceptors: II. Influence on monoaminergic transmission, motor function, and anxiety in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(3), 1206-1222.
- Millan, M. J. (2004). The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 371-384.
- Misra, B. B., & Dey, S. (2013). Evaluation of in vivo anti-hyperglycemic and antioxidant potentials of  $\alpha$ -santalol and sandalwood oil. *Phytomedicine*, 20(5), 409-416.
- Miyazawa, M., & Hisama, M. (2003). Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6413-6422.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses

- depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of psychiatric research*, 46(3), 331-340.
- Moretti, M., Colla, A., de Oliveira Balen, G., dos Santos, D. B., Budni, J., de Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S. (2012). Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of psychiatric research*, 46(3), 331-340.
- Naranjo, C. A., Tremblay, L. K., & Busto, U. E. (2001). The role of the brain reward system in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(4), 781-823
- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Mol Psychiatry*, 1(4), 336-342.
- Nemeroff, C. B., & Owens, M. J. (2002). Treatment of mood disorders. *Nature neuroscience*, 5, 1068.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.
- Neis, V. B., Bettio, L. E., Moretti, M., Rosa, P. B., Ribeiro, C. M., Freitas, A. E., ... & Rodrigues, A. L. S. (2016). Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150, 108-114.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- Ohkubo, T., & Shibata, M. (1997). The selective capsaicin antagonist capsazepine abolishes the antinociceptive action of eugenol and guaiacol. *Journal of dental research*, 76(4), 848-851.
- O'Leary, O. F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Faster, better, stronger: towards new antidepressant therapeutic strategies. *European journal of pharmacology*, 753, 32-50.
- Overstreet, D. H. (2012). Modeling depression in animal models. In *Psychiatric Disorders* (pp. 125-144). Humana Press.
- Pallavi, P., Sagar, R., Mehta, M., Sharma, S., Subramaniam, A., Shamshi, F., ... & Mukhopadhyay, A. K. (2013). Serum neurotrophic factors in adolescent depression: gender difference and correlation with clinical severity. *Journal of affective disorders*, 150(2), 415-423.
- Palazidou, E. (2012). The neurobiology of depression. *British medical bulletin*, 101(1), 127-145.
- Palta, P., Samuel, L. J., Miller III, E. R., & Szanton, S. L. (2014). Depression and oxidative stress: results from a meta-analysis of observational studies. *Psychosomatic medicine*, 76(1), 12.

- Papakostas, G. I., Thase, M. E., Fava, M., Nelson, J. C., & Shelton, R. C. (2007). Are antidepressant drugs that combine serotonergic and noradrenergic mechanisms of action more effective than the selective serotonin reuptake inhibitors in treating major depressive disorder? A meta-analysis of studies of newer agents. *Biological psychiatry*, 62(11), 1217-1227.
- Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in neurosciences*, 31(9), 464-468.
- Parker, K. J., Schatzberg, A. F., & Lyons, D. M. (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Hormones and behavior*, 43(1), 60-66.
- Patel, S. S., & Udayabanu, M. (2014). *Urtica dioica* extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice. *Metabolic brain disease*, 29(1), 121-130.
- Pechtel, P., & Pizzagalli, D. A. (2011). Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. *Psychopharmacology*, 214(1), 55-70.
- Phillipson, J. D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56(3), 237-243.
- Pitta, S., Augustine, B. B., Kasala, E. R., Sulakhiya, K., Ravindranath, V., & Lahkar, M. (2013). Honokiol reverses depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels induced by chronic corticosterone injections in mice. *Pharmacognosy Journal*, 5(5), 211-215.
- Ponte, E. L., Sousa, P. L., Rocha, M. V., Soares, P. M., Coelho-de-Souza, A. N., Leal-Cardoso, J. H., & Assreuy, A. M. (2012). Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacological Reports*, 64(4), 984-990.
- Pragadheesh, V. S., Saroj, A., Yadav, A., Chanotiya, C. S., Alam, M., & Samad, A. (2013). Chemical characterization and antifungal activity of *Cinnamomum camphora* essential oil. *Industrial crops and products*, 49, 628-633.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Raison, V. M. C. L. (2009). Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in bioscience*, 14, 5291-5338.
- Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Mello, C. F., & Souza, D. O. (1996). Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Wky Avoidance Tasks. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 150-156.
- Rosa, P. B., Ribeiro, C. M., Bettio, L. E., Colla, A., Lieberknecht, V., Moretti, M., & Rodrigues, A. L. S. (2014). Folic acid prevents depressive-like behavior induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 127, 1-6.

- Sánchez-Vioque, R., Polissiou, M., Astraka, K., De los Mozos-Pascual, M., Tarantilis, P., Herraiz-Peñalver, D., & Santana-Méridas, O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial crops and products*, 49, 150-159.
- Savitz, J. B., & Drevets, W. C. (2009). Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*, 164(1), 300-330.
- Sayyah, M., Valizadeh, J., & Kamalinejad, M. (2002). Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole-and maximal electroshock-induced seizures. *Phytomedicine*, 9(3), 212-216.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American journal of Psychiatry*, 122(5), 509-522.
- Shalam, M. D., Shantakumar, S. M., & Narasu, M. L. (2007). Pharmacological and biochemical evidence for the antidepressant effect of the herbal preparation Trans-01. *Indian Journal of pharmacology*, 39(5), 231.
- Shulman, K. I., Herrmann, N., & Walker, S. E. (2013). Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression. *CNS drugs*, 27(10), 789-797.
- Shyti, R., Eikermann-Haerter, K., van Heiningen, S. H., Meijer, O. C., Ayata, C., Joëls, M., ... & Tolner, E. A. (2015). Stress hormone corticosterone enhances susceptibility to cortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *Experimental neurology*, 263, 214-220.
- Sigwalt, A. R., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., Lanza, S., ... & De Matos, F. J. (2011). Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*, 192, 661-674.
- Silva, M. C. C., Sampaio, L. R. L., de Araújo, D. P., Araújo, P. V. P., Monte, A. S., Rodrigues, F. T. S., ... & Vasconcelos, S. M. M. (2014). Central effects of lipoic acid associated with paroxetine in mice. *American journal of therapeutics*, 21(2), 85-90.
- Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., & Przewlocki, R. (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience*, 286, 141-150.
- Silva-Comar, F. M. D. S., Wiirzler, L. A. M., Silva-Filho, S. E., Kummer, R., Pedroso, R. B., Spironello, R. A., ... & Cuman, R. K. N. (2014). Effect of estragole on leukocyte behavior and phagocytic activity of macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
- Simões, C. M. O.; Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia – da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 18, p. 467-495.
- Senanayake, U. M., Wills, R. B. H., & Lee, T. H. (1977). Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. *Phytochemistry*, 16(12), 2032-2033.

- Sheline, Y. I., Gado, M. H., & Kraemer, H. C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *American Journal of Psychiatry*, 160(8), 1516-1518.
- Southwick, S. M., Vythilingam, M., & Charney, D. S. (2005). The psychobiology of depression and resilience to stress: implications for prevention and treatment. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 1, 255-291.
- Stahl, S. M. (2014). *Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas*. São Paulo: Guanabara Koogan.
- Stahl, S. M., Grady, M. M., Moret, C., & Briley, M. (2005). SNRIs: the pharmacology, clinical efficacy, and tolerability in comparison with other classes of antidepressants. *CNS spectrums*, 10(9), 732-747.
- Sterner, E. Y., & Kalynchuk, L. E. (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 777-790.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Swaab, D. F., Bao, A. M., & Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing research reviews*, 4(2), 141-194.
- Timmermans, W., Xiong, H., Hoogenraad, C. C., & Krugers, H. J. (2013). Stress and excitatory synapses: from health to disease. *Neuroscience*, 248, 626-636.
- Tofoli, S. M. D. C., Baes, C. V. W., Martins, C. M. S., & Jurueña, M. (2011). Early life stress, HPA axis, and depression. *Psychology & Neuroscience*, 4(2), 229-234.
- Torres, G. E., Gainetdinov, R. R., & Caron, M. G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1), 13.
- Vasconcelos, A. S., Oliveira, I., Vidal, L., Rodrigues, G. C., Gutierrez, S. J., Barbosa-Filho, J. M., ... & Sousa, F. C. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(4), 394-403.
- Victoria, F. N., de Siqueira Brahm, A., Savegnago, L., & Lenardão, E. J. (2013). Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of E. uniflora L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neuroscience letters*, 544, 105-109.
- Xavier, V. B., Vargas, R. M. F., Minteguiaga, M., Umpiérrez, N., Dellacassa, E., & Cassel, E. (2013). Evaluation of the key odorants of Baccharis anomala DC essential oil: New applications for known products. *Industrial crops and products*, 49, 492-496.
- Wang, Z. J., Levinson, S. R., Sun, L., & Heinbockel, T. (2014). Identification of both GABAA receptors and voltage-activated Na<sup>+</sup> channels as molecular targets of anticonvulsant  $\alpha$ -asarone. *Frontiers in pharmacology*, 5, 40.

- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural pharmacology*, 13(3), 169-188.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52(2), 90-110.
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 37(10), 2331-2371.
- World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates.
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 243-248.
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2015). The effect of imipramine, ketamine, and zinc in the mouse model of depression. *Metabolic brain disease*, 30(6), 1379-1386.
- Wu, B. N., Hwang, T. L., Liao, C. F., & Chen, I. J. (1994). Vaninlolol: a new selective  $\beta$ 1-adrenoceptor antagonist derived from vanillin. *Biochemical pharmacology*, 48(1), 101-109.
- Yalcin, I., Aksu, F., & Belzung, C. (2005). Effects of desipramine and tramadol in a chronic mild stress model in mice are altered by yohimbine but not by pindolol. *European journal of pharmacology*, 514(2-3), 165-174.
- Ye, Y., Wang, G., Wang, H., & Wang, X. (2011). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neuroscience letters*, 503(1), 15-19.
- Yi, L. T., Liu, B. B., Li, J., Luo, L., Liu, Q., Geng, D., ... & Wu, D. (2014). BDNF signaling is necessary for the antidepressant-like effect of naringenin. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 48, 135-141.
- Zeni, A. L. B., Camargo, A., & Dalmagro, A. P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.
- Zhao, Y., Shen, J., Su, H., Li, B., Xing, D., & Du, L. (2008). Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. *Brain research*, 1191, 148-156.

## **ANEXOS**



## Anexo I



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Investigação da ação do metileugenol em modelos comportamentais de convulsão em camundongos” protocolo nº 022/2017 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 05/10/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2018
Espécie/linhagem	Camundongo Swiss ( <i>Mus musculus</i> )
Número de animais	251 animais
Idade/peso	2 – 3 meses/ 25 - 35 g
Sexo	Machos
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Prof. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da CEUA-UFPB

## Anexo II

### INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDEPRESSIVA DO ORTO-EUGENOL EM MODELO COMPORTAMENTAL DE DEPRESSÃO-SÍMILE INDUZIDO POR DEXAMETASONA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

*Alana Natalícia Vasconcelos de Araújo<sup>a</sup>, Mirian Graciela Stiebbe Salvadori\**

*<sup>a</sup>Nutricionista, mestranda no Programa de Pós-Graduação em Neurociências Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.*

*<sup>b</sup>Docente do Programa de Pós-Graduação em Neurociências Cognitiva e Comportamento, Universidade Federal da Paraíba – UFPB.*

\*Autor para Correspondência. Tel.: +51 83 98743-0004.

Endereço de email: mirian.salvadori@gmail.com

**RESUMO:** A depressão é um transtorno do humor grave, recorrente e incapacitante. Acredita-se que sua etiologia seja resultado de várias anormalidades que interagem com fatores ambientais, sendo o estresse o principal fator ambiental com impacto para o surgimento da doença. Os óleos essenciais possuem uma variedade de compostos bioativos, como os fenilpropanoides, que apresentam distintas atividades farmacológicas. O presente estudo investigou a potencial atividade antidepressiva do orto-eugenol em camundongos fêmeas adultas submetidas ao modelo de estresse induzido pela dexametasona. Para investigar o perfil antidepressor do orto-eugenol, os animais foram pré-administrados com dexametasona 3h30min antes da realização dos testes comportamentais. Os resultados mostraram que a administração aguda de dexametasona causou um comportamento semelhante à depressão, conforme indicado pela diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda, latência para o *grooming* no teste de borrifagem de sacarose, como também não alterou a atividade locomotora no teste do campo aberto. O orto-eugenol apresentou atividade antidepressiva mais proeminente na dose de 50 mg/kg nos testes descritos, e não alterou a atividade locomotora dos animais. Seu mecanismo de ação se deu pelo antagonismo do receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e  $\alpha_1$  adrenérgico.

**Unitermos:** Eugenol, Estresse, Fenilpropanoide, Mecanismo de ação.

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão é um distúrbio heterogêneo e multifatorial, que afeta negativamente os sentimentos, pensamentos e atitudes das pessoas, exibindo vários sintomas cujo o mais comum é a perda de interesse ou prazer nas atividades e profundo sentimento de tristeza. (American Psychiatric Association, 2017). Mundialmente, cerca de 322 milhões de pessoas sofrem de

depressão apresentando uma prevalência média de 4,4% na população geral, sendo mais frequente em mulheres com idade entre 55 e 74 anos (World Health Organization, 2017). O gênero feminino apresenta maior risco de desenvolver depressão, além de ser considerado um fator de risco para a depressão resistente ao tratamento. Portanto, recente estudos pré-clínicos em depressão foram realizados fazendo o uso de animais do gênero feminino (Ye *et al.*, 2012; Carrier and Kabbaj, 2013; Silva *et al.*, 2013).

Ao que se refere a etiologia da depressão, esta é multifatorial, e diferentes hipóteses foram postuladas como mecanismos fisiopatológicos, como a teoria que envolve o estresse e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A ligação entre estresse e depressão foi inicialmente pensado a partir de observações da hiperatividade do eixo HPA, onde níveis elevados de cortisol foram encontrados em mais de 50% dos pacientes com transtorno depressivo, como também a falta da liberação pulsátil do cortisol (Sternern and Kalynchuk, 2010). Estudos indicam que a hiperatividade do eixo HPA podem ser induzidos pelo comprometimento dos mecanismos de inibição de feedback (Holsboer, 2000; Pariante and Miller, 2001).

Em roedores, achados indicaram que administração única e repetida de dexametasona (DEXA) e corticosterona (CORT) ativaram genes relacionados ao estresse, e induziram o comportamento depressivo avaliado pelos testes comportamentais do nado forçado, transição claro-escuro e preferência por sacarose e, modificou a atividade de fármacos antidepressivos de várias classes (Skupio *et al.*, 2014; Wróbel *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2008; Pitta *et al.*, 2013). Assim, o modelo da administração de DEXA é válido para o estudo da fisiopatologia da depressão e para avaliar a eficácia de novas drogas antidepressivas (Sternern and Kalynchuk, 2010).

Os fármacos utilizados na atualidade apresentam um início de ação lento e muitos eventos adversos, somado ao problema de que uma grande parcela dos pacientes não respondem bem a terapia com antidepressivos (Nestler *et al.*, 2002; Berlim and Turecki, 2007). Neste cenário, os produtos naturais têm um grande potencial como fonte de novos medicamentos. E o uso destes como matérias-primas para a síntese de substância bioativas, tem sido amplamente realizada ao longo do tempo. Sendo assim, o orto-eugenol, um isômero sintético do eugenol, que já demonstrou ser uma substância biologicamente ativa como evidenciado por Fônsaca e colaboradores (2016), pode ser uma droga em potencial para o tratamento da depressão.

Neste contexto, não encontramos qualquer relatório na literatura científica quanto à capacidade antidepressiva do orto-eugenol, assim, despertando o interesse de avaliar a atividade

antidepressiva e os possíveis mecanismos de ação da substância em um modelo de depressão induzido por dexametasona em camundongos fêmeas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas, albinas Swiss, pesando entre 25-35g, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba. Os animais foram mantidos sob uma temperatura controlada ( $21 \pm 1^\circ \text{C}$ ), com livre acesso a ração e água, com ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6h00 às 18h00. Todos os procedimentos experimentais foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do LTF/UFPB, sob a certidão nº 022/2017.

### 2.2. Grupos e drogas utilizadas

Os foram divididos em seis grupos de oito animais: salina, dexametasona + salina, dexametasona + imipramina, dexametasona + orto-eugenol (50 mg/kg), dexametasona + ortoeugenol (75 mg/kg) e dexametasona + orto-eugenol (100 mg/kg). As doses de orto-eugenol foram as mesmas utilizadas por Fonsêca e colaboradores (2016). Todos os fármacos foram administrados em um volume de 0,1 mL/10 g de peso corporal. A dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA, 64µg/kg, dissolvida em solução salina a 0,9%), foi administrada via subcutânea 3h30min antes da realização dos testes. A imipramina (Norvartis Biociências Brasil, 10 mg/kg dissolvida em solução salina a 0,9%) foi administrada via intraperitoneal 30 min antes da realização dos testes. O orto-eugenol (Sigma-Aldrich, EUA, dissolvido em em solução salina a 0,9% contendo 1% de Tween-80) foi administrado por via intraperitoneal 30 min antes dos testes.

Para investigação dos possíveis mecanismos de ação da atividade antidepressiva do orto-eugenol, investigamos as vias dos receptores serotoninérgicos 5HT<sub>2A/2C</sub>, receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub> e a via dos receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ .

Para investigação de um possível envolvimento do sistema noradrenérgico na resposta antidepressiva do orto-eugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.), prazosin (1 mg/kg i.p., antagonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ), e prazosin + orto-eugenol.

O prazosin foi administrado 15 min antes do orto-eugenol, e decorridos 30 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

Para investigação de um possível envolvimento do sistema serotoninérgico na resposta antidepressiva do orto-eugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.), ritanserina (4 mg/kg i.p., antagonista seletivo de receptores 5HT<sub>2A/2C</sub>), e ritanserina + orto-eugenol. A ritanserina foi administrada 30 min antes do orto-eugenol, e decorridos 30 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

Para verificação de um possível envolvimento do sistema dopaminérgico na resposta antidepressiva do orto-eugenol, os animais receberam inicialmente dexametasona, a exceção do salina, e foram tratados com: veículo (Tween 80 - 1% i.p.), orto-eugenol (50 mg/kg i.p.), SCH23390 (4 mg/kg i.p., antagonista dos receptores D<sub>1</sub>), e SCH23390 + orto-eugenol. O SCH23390 foi administrada 15 min antes do orto-eugenol, e decorridos 30 minutos do último tratamento os animais foram submetidos ao teste de suspensão da cauda.

Todos os experimentos foram filmados e analisados de forma duplo cego.

### 2.3. Teste de Suspensão da Cauda

Este teste foi realizado com base no método de Stéru e colaboradores (1985). Este método consistiu em suspender os camundongos pela cauda a 50 cm do chão, com o auxílio de uma fita adesiva colocada a 1cm da ponta da cauda, na bancada de experimentos. Cada animal permaneceu nesta posição durante 6 min. Analisou-se os seguintes parâmetros: latência para imobilidade e tempo total de imobilidade.

### 2.4. Teste de Borrifagem de Sacarose

Os camundongos foram borrifados no dorso com uma solução aquosa contendo 10% de sacarose, em seguida foram alocados em caixas individuais, e então foi contabilizado por um período de 5 minutos a latência para o início da autolimpeza (*grooming*) e o tempo total de autolimpeza (*grooming*) (Willner, 2005; Isingrini *et al.*, 2010).

### 2.5. Teste do Campo Aberto

Originalmente descrito por Hall (1930) sendo um protocolo bastante utilizado para avaliar o efeito de drogas sobre a emocionalidade, atividade locomotora espontânea e comportamento exploratório dos animais (Pruet & Belzung, 2003).

Os animais foram colocados no centro do campo aberto e por um período de 5 minutos os seguintes parâmetros foram analisados: a) número de cruzamentos entre os quadrantes (quando o animal atravessa colocando três patas); b) tempo total de permanência no centro do aparato; c) quantidade de *rearings* (levantamentos) realizado e, c) latência para o primeiro *rearing* (Almeida, 2006).

## 2.6. Análise Estatística

O método de Análise de Variância *one-way* (ANOVA) foi aplicado na análise dos dados paramétricos, seguido pelo teste *post hoc* de Dunnet ou Tukey. Os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), sendo as diferenças consideradas significativas quando apresentassem um nível de significância  $p < 0,05$ . Os dados numéricos foram aplicados no programa Graph Pad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA).

## 3. RESULTADOS

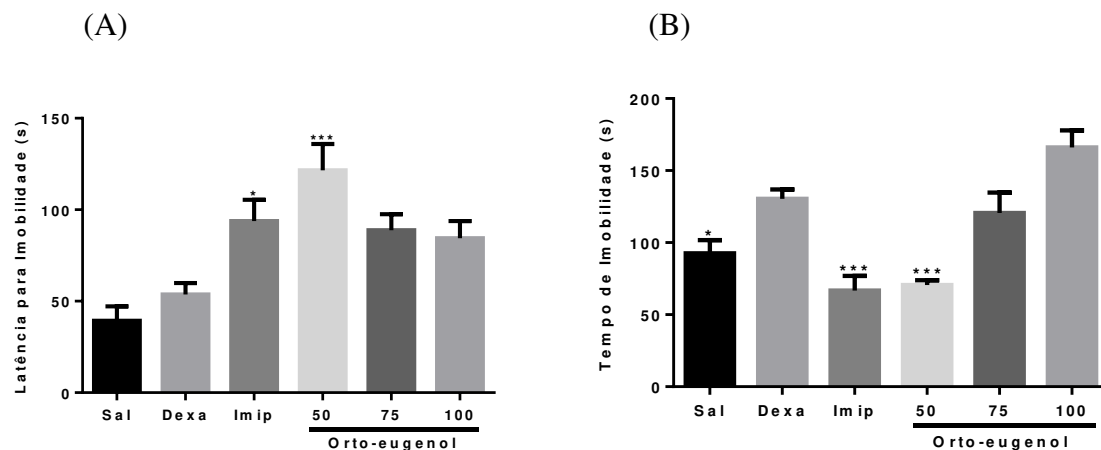
Os efeitos da administração do orto-eugenol na latência para imobilidade e tempo de imobilidade é mostrado na Figura 1. O orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $121,5 \pm 14,3$ ) e imipramina ( $93,7 \pm 11,7$ ), apresentaram uma maior latência para imobilidade quando comparados com o grupo Dexa ( $53,7 \pm 6,2$ ) [ $F(5, 42) = 8,634$ ;  $p < 0,0001$ ]. Já o grupo orto-eugenol nas doses de 75 mg/kg ( $88,7 \pm 8,8$ ), 100 mg/kg ( $88,7 \pm 9,3$ ), e salina ( $39,2 \pm 7,9$ ) não apresentaram efeito significativo. Na avaliação do tempo de imobilidade, o grupo salina ( $92,5 \pm 9,1$ ), orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $70,6 \pm 3,3$ ), e imipramina ( $66,7 \pm 10,1$ ), diminuíram o tempo de imobilidade quando comparados ao grupo Dexa ( $130,4 \pm 6,56$ ) [ $F(5, 42) = 15,19$ ;  $p < 0,0001$ ]. O orto-eugenol na dose de 75 mg/kg ( $120,5 \pm 14,2$ ) e 100 mg/kg ( $166,1 \pm 11,7$ ) não apresentaram efeito significativo..

Os resultados obtidos para a latência para o *grooming* e tempo de *grooming* (autolimpeza) no teste de borrifagem de sacarose podem ser observados no Figura 2.. Os grupos pré-tratados com salina ( $18,5 \pm 1,5$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $23,0 \pm 5,4$ ), 75 mg/kg ( $15,25 \pm 1,9$ ), 100 mg/kg ( $13,0 \pm 2,4$ ), e imipramina ( $11,0 \pm 3,8$ ), diminuíram a latência para o *grooming* quando comparados ao grupo Dexa ( $54,5 \pm 9,56$ ) [ $F(5, 42) = 10,60$ ;  $p < 0,0001$ ]. Na avaliação do tempo de *grooming*, orto-eugenol na dose de 50 mg/kg ( $198,5 \pm 8,8$ ), 100 mg/kg ( $187,1 \pm 19,2$ ), e imipramina ( $202,3 \pm 7,6$ ), aumentaram o tempo de *grooming* quando

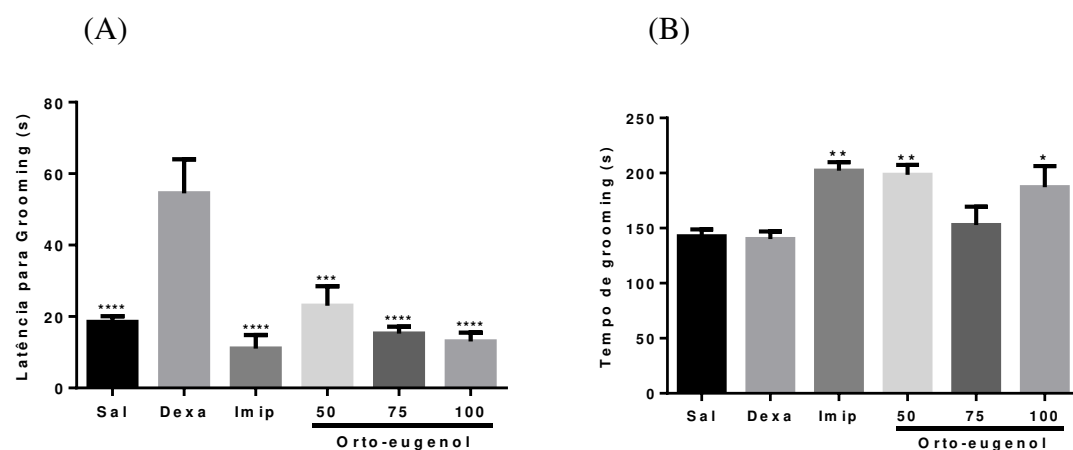
comparados ao grupo Dexta ( $140,1 \pm 6,7$ ) [ $F(5, 42) = 6,334$ ;  $p = 0,0002$ ]. O grupo salina ( $142,5 \pm 6,3$ ) e orto-eugenol na dose de 75 mg/kg ( $154,6 \pm 12,9$ ), não apresentaram diferenças estatísticas.

Os efeitos do orto-eugenol sobre os parâmetros do teste do campo aberto estão na Figura 3. Na avaliação do parâmetro número de cruzamentos, não encontrou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pré-tratados com salina ( $91,7 \pm 5,4$ ), Dexta ( $66,1 \pm 7,1$ ), imipramina ( $89,3 \pm 3,7$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $67,6 \pm 11,8$ ), 75 mg/kg ( $90,2 \pm 9,9$ ), e 100 mg/kg ( $77,3 \pm 4,5$ ) [ $F(5, 42) = 2,298$ ;  $p = 0,0621$ ]. No parâmetro tempo no centro, também não foi encontrado diferenças estatísticas entre os grupos salina ( $35,2 \pm 6,0$ ), Dexta ( $27,0 \pm 4,3$ ), imipramina ( $40,1 \pm 0,5$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $33,0 \pm 4,1$ ), 75 mg/kg ( $42,0 \pm 3,7$ ), e 100 mg/kg ( $40,0 \pm 4,4$ ) [ $F(5, 42) = 1,777$ ;  $p = 0,1386$ ]. Na avaliação da latência para o rearing os grupos tratados salina com ( $20,0 \pm 2,2$ ), Dexta ( $18,6 \pm 3,0$ ), imipramina ( $25,8 \pm 3,0$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $24,5 \pm 5,2$ ), 75 mg/kg ( $26,0 \pm 3,9$ ), e 100 mg/kg ( $25,0 \pm 3,5$ ) não apresentaram efeito significativo [ $F(5, 42) = 0,7671$ ;  $p = 0,5787$ ]. No parâmetro número de *rearing* também não foi encontrado efeito dos pré-tratamentos com salina ( $33,8 \pm 2,8$ ), Dexta ( $29,6 \pm 4,2$ ), imipramina ( $31,1 \pm 2,7$ ), orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg ( $28,1 \pm 3,9$ ), 75 mg/kg ( $32,6 \pm 4,1$ ), e 100 mg/kg ( $33,5 \pm 2,2$ ) [ $F(5, 42) = 0,7671$ ;  $p = 0,5787$ ].

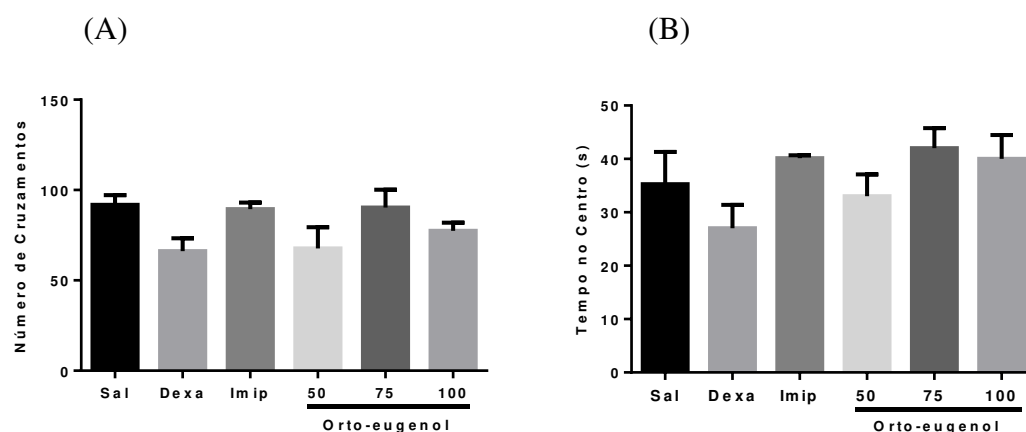
A Figura 4 mostra o resultado dos antagonistas no efeito antidepressivo do orto-eugenol no teste de suspensão da cauda. Os animais pré-tratados com SCH2330 ( $222,9 \pm 2,6$ ), SCH23390 + orto-eugenol ( $197,1 \pm 13,9$ ), e prazosin + orto-eugenol ( $141,5 \pm 13,6$ ), aumentaram o tempo de imobilidade quando comparados com orto-eugenol ( $79 \pm 6,1$ ) [ $F(8, 63) = 18,74$ ;  $p < 0,0001$ ]. A ritanserina ( $97,6 \pm 6,3$ ), ritanserina + orto-eugenol ( $133,4 \pm 21,15$ ), prazosin ( $126,0 \pm 11,0$ ) não apresentaram efeito significativo quando comparados com o orto-eugenol.



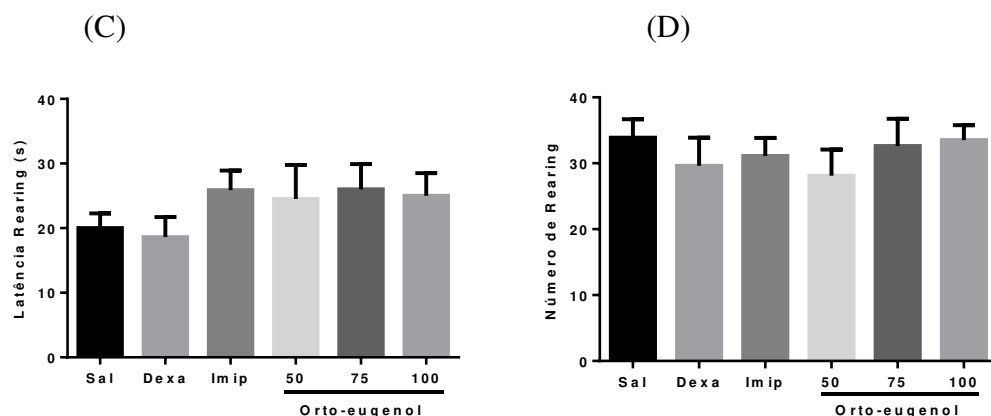
**Figura 1** - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre latência para imobilidade (A) e o tempo de imobilidade (A) no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus dexametasona.



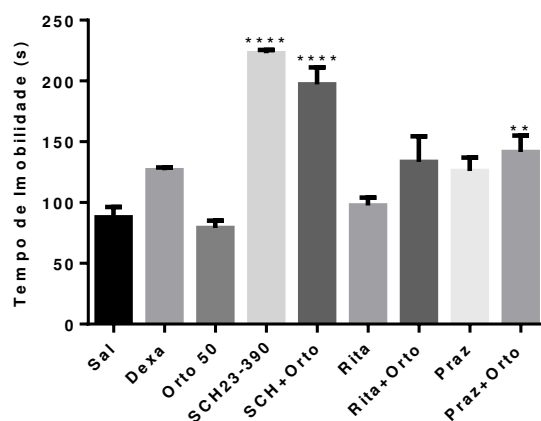
**Figura 2** - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre a latência para o *grooming* e tempo de *grooming* no teste de borrifagem de sacarose. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus dexametasona.







**Figura 3** - Efeito do orto-eugenol (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.), salina (i.p.), dexametasona (64 µg/kg s.c.) e imipramina (10 mg/kg i.p.) sobre o número de cruzamentos (a), tempo no centro (B), latência para o *rearing* (C) e número de *rearing* no teste do campo aberto (D). Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Dunnett's



**Figura 4** - Efeito de antagonistas específicos na atividade antidepressiva do orto-eugenol no teste de suspensão da cauda. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). ANOVA *one-way* seguido pelo Teste de Tukey's. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus orto-eugenol.

#### 4. DISCUSSÃO

Nossos resultados indicaram que o orto-eugenol apresentou atividade antidepressiva nos testes de suspensão da cauda, através da diminuição do tempo de imobilidade e aumento da latência para imobilidade; maior tempo de *grooming* (autolimpeza) e diminuição da latência para o *grooming* no teste de borrifagem de sacarose; além de não alterar a atividade locomotora dos animais no campo aberto.

O teste de suspensão da cauda é um dos modelos mais utilizados para a triagem de novas drogas antidepressivas, é baseado na premissa de que o animal quando colocado diante de situação inescapável, preso pela cauda, desenvolve uma postura de imobilidade após tentativas

iniciais de fuga. E tal situação é percebida como uma desistência, sendo descrita como um estado depressivo. As substâncias antidepressivas revertem esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade (Willner and Mitchell, 2002; Holmes, 2003; Steru *et al.*, 1985).

Nossos achados evidenciam a eficácia do modelo de estresse induzido pela DEXA, visto que sua administração aguda foi capaz de aumentar o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda comparado ao grupo salina, produzindo um comportamento depressivo-símile. Contudo, no parâmetro latência para imobilidade a DEXA não apresentou efeito significativo em relação ao grupo salina. Corroborando com os nossos resultados, Li e colaboradores (2014) demonstraram que o protocolo da DEXA aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste de suspensão da cauda quando comparada ao grupo contro

O orto-eugenol na dose de 50 mg/kg apresentou atividade antidepressiva no modelo de depressão induzido por DEXA, através da diminuição do tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda. Tal resultado se assemelha a imipramina, o antidepressivo utilizado como droga padrão, que também diminuiu o tempo de imobilidade. Na análise do parâmetro latência para imobilidade, o orto-eugenol nas dose de 50 mg/kg aumentou a latência, reforçando a atividade antidepressiva da substância.

Similar aos nossos achados, um estudo realizado com a Riparina III, uma acalmida natural extraída do fruto da *Aniba riparia*, demonstrou efeito antidepressivo no modelo de depressão induzido por CORT em camundongos, diminuindo o tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda (Vasconcelos *et al.*, 2015).

Para corroborar com os achados obtidos no teste de suspensão da cauda, foi realizado o teste de borrifagem de sacarose. O orto-eugenol nas doses de 50 mg/kg e 100mg/kg aumentaram o tempo de *grooming*, apresentando um efeito equivalente ao da droga padrão imipramina. Como também, diminuíram a latência para o *grooming*, incluindo a dose de 75 mg/kg de orto-eugenol, sendo novamente compatíveis com a da imipramina. O grupo DEXA não apresentou efeito no tempo de *grooming*, contudo aumentou a latência quando comprado ao controle, sendo um indicativo de seu efeito antidepressivo. No estudo realizado por Zeni e colaboradores (2017), o ácido ferúlico, um composto fenólico presente em várias espécies de plantas, elevou o tempo de *grooming* de camundongos machos submetidos ao protocolo da CORT (20 mg/kg) administrada por via oral durante 21 dias.

O teste do campo aberto é largamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora espontânea e fornece indícios do estado emocional dos roedores (Rodrigues *et al.*, 1996; Choleris *et al.*, 2001; Prut and Belzung, 2003). Por meio do número de cruzamentos ficou

demonstrado que nem o orto-eugenol, imipramina ou dexametasona são drogas que alteram a atividade locomotora dos animais. Esse resultado descarta a possibilidade de que, o parâmetro tempo de imobilidade no TST, os animais estejam respondendo devido a uma ação sedativa ou estimulante, visto que o tratamento com dexametasona aumenta o tempo de imobilidade dos animais, enquanto orto-eugenol e imipramina diminuem.

A avaliação da atividade locomotora do animal no centro do campo aberto é uma medida mais seletiva de ansiedade (Gorisch & Schwarting 2006; Kuleskaya & Voikar, 2014). Outro parâmetro como o número de *rearing* também é analisado. Dessa forma, notou-se que a administração de orto-eugenol, imipramina e dexametasona não alterou a latência e o número de *rearing*.

A depressão tem sido largamente associada a uma deficiência de neurotransmissão noradrenérgica, dopaminérgica e serotoninérgica. Além disso, a alteração no sistema monoaminérgico é uma das principais causas envolvidas na fisiopatologia e tratamento da depressão (Urani *et al.*, 2005; Elhwuegi, 2004; Millan, 2004).

Levando em consideração a grande aceitação do teste de suspensão da cauda como forma de investigação de drogas antidepressivas, ele foi escolhido investigar os possíveis mecanismos de ação do orto-eugenol na dose 50 mg/kg, a qual apresentou efeito antidepressivo mais pronunciado nos testes descritos.

Nossos resultados mostram que o sistema dopaminérgico e adrenérgico estão envolvidos no potencial efeito antidepressivo do orto-eugenol, visto que o pré-tratamento dos camundongos com SCH23390 (antagonista de receptores D<sub>1</sub>), prazosin (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), impediram o efeito protetor induzido pelo orto-eugenol, aumentando assim a imobilidade no teste da suspensão da cauda.

Estudos mostram que o sistema dopaminérgico está fortemente relacionado na regulação do humor, e uma quantidade considerável de evidências demonstram a eficácia dos antidepressivos com efeitos dopaminérgicos no tratamento da depressão. Similarmente ao sistema dopaminérgico, os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico tem sido um alvo valioso para os antidepressivos. A depressão parece estar associada, pelo menos em parte, a uma hipofunção dos sistemas noradrenérgico e serotoninérgico, e alguns antidepressivos agem aumentando a disponibilidade sináptica desses neurotransmissores (Teixeira *et al.*, 2011).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, que a administração de orto-eugenol em animais submetidos ao modelo de depressão induzido por dexametasona produziu um efeito

antidepressivo relevante sem alterar a atividade locomotora dos animais, e o seu efeito pode estar associado com o envolvimento do sistema dopaminérgico D<sub>1</sub> e  $\alpha_1$  adrenérgico.

## REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association. (2017, April). *What is Depression?*. Recuperado em 11 de fevereiro, 2018, do <https://www.psychiatry.org/patients-families/depression/what-is-depression>.
- Berlim, M. T., & Turecki, G. (2007). What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. *European Neuropsychopharmacology*, 17(11), 696-707.
- Carrier, N., & Kabbaj, M. (2013). Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*, 70, 27-34.
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(3), 235-260.
- Elhwuegi, A. S. (2004). Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(3), 435-451.
- Fonsêca, D. V., Salgado, P. R., Neto, H. D. C. A., Golzio, A. M., Caldas Filho, M. R., Melo, C. G., ... & Almeida, R. N. (2016). Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. *International immunopharmacology*, 38, 402-408.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477.
- Holmes, P. V. (2003). Rodent models of depression: reexamining validity without anthropomorphic inference. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 15(2).
- Li, S. X., Fujita, Y., Zhang, J. C., Ren, Q., Ishima, T., Wu, J., & Hashimoto, K. (2014). Role of the NMDA receptor in cognitive deficits, anxiety and depressive-like behavior in juvenile and adult mice after neonatal dexamethasone exposure. *Neurobiology of disease*, 62, 124-134.
- Millan, M. J. (2004). The role of monoamines in the actions of established and “novel” antidepressant agents: a critical review. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 371-384.
- Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1), 13-25.
- Pariante, C. M., & Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biological psychiatry*, 49(5), 391-404.
- Pitta, S., Augustine, B. B., Kasala, E. R., Sulakhiya, K., Ravindranath, V., & Lahkar, M. (2013). Honokiol reverses depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels induced by chronic corticosterone injections in mice. *Pharmacognosy Journal*, 5(5), 211-215.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Rodrigues, A. L. S., Rocha, J. B. T., Mello, C. F., & Souza, D. O. (1996). Effect of Perinatal Lead Exposure on Rat Behaviour in Open-Field and Two-Wky Avoidance Tasks. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 79(3), 150-156.

- Silva, M. C. C., de Sousa, C. N. S., Sampaio, L. R. L., Ximenes, N. C., Araújo, P. V. P., da Silva, J. C., ... & Vasconcelos, S. M. M. (2013). Augmentation therapy with alpha-lipoic acid and desvenlafaxine: a future target for treatment of depression?. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 386(8), 685-695.
- Sterner, E. Y., & Kalynchuk, L. E. (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 777-790.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367-370.
- Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., & Przewlocki, R. (2015). Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression. *Neuroscience*, 286, 141-150.
- Teixeira, C. P. L., de Melo, C. T. V., de Araújo, F. L. O., de Carvalho, A. M. R., Silva, M. I. G., Barbosa-Filho, J. M., ... & de Sousa, F. C. F. (2013). Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(2), 129-137.
- Urani, A., Chourbaji, S., & Gass, P. (2005). Mutant mouse models of depression: candidate genes and current mouse lines. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 805-828.
- Vasconcelos, A. S., Oliveira, I., Vidal, L., Rodrigues, G. C., Gutierrez, S. J., Barbosa-Filho, J. M., ... & Sousa, F. C. (2015). Subchronic administration of riparin III induces antidepressant-like effects and increases BDNF levels in the mouse hippocampus. *Fundamental & clinical pharmacology*, 29(4), 394-403.
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). Animal models of depression: a diathesis/stress approach. *Biological psychiatry*, 701-726.
- World Health Organization. (2017). Depression and other common mental disorders: global health estimates.
- Wróbel, A., Serefko, A., Wlaź, P., & Poleszak, E. (2014). The depressogenic-like effect of acute and chronic treatment with dexamethasone and its influence on the activity of antidepressant drugs in the forced swim test in adult mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 54, 243-248.
- Ye, L., Hu, Z., Du, G., Zhang, J., Dong, Q., Fu, F., & Tian, J. (2012). Antidepressant-like effects of the extract from *Cimicifuga foetida* L. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), 683-691.
- Zeni, A. L. B., Camargo, A., & Dalmagro, A. P. (2017). Ferulic acid reverses depression-like behavior and oxidative stress induced by chronic corticosterone treatment in mice. *Steroids*, 125, 131-136.
- Zhao, Y., Shen, J., Su, H., Li, B., Xing, D., & Du, L. (2008). Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. *Brain research*, 1191, 148-156.